

SÉRIE A, N° 2352

N° D'ORDRE : 3124

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Joseph STOLKOWSKI

1^{re} THÈSE. — Essai sur le déterminisme des formes minéralogiques du calcaire
chez les êtres vivants (Calcaires coquilliers).

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 7 octobre 1950, devant la Commission d'examen.

MM. A. PRENANT,	<i>Président.</i>
R. WURMSER,	} <i>Examineurs.</i>
P. JOB,	

MASSON & C^{ie}, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS (VI^e)

1950

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

*INFLUENCE
DE L'EMPLOI DU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE
DANS LES RECHERCHES BIOLOGIQUES*

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 3 octobre 1950

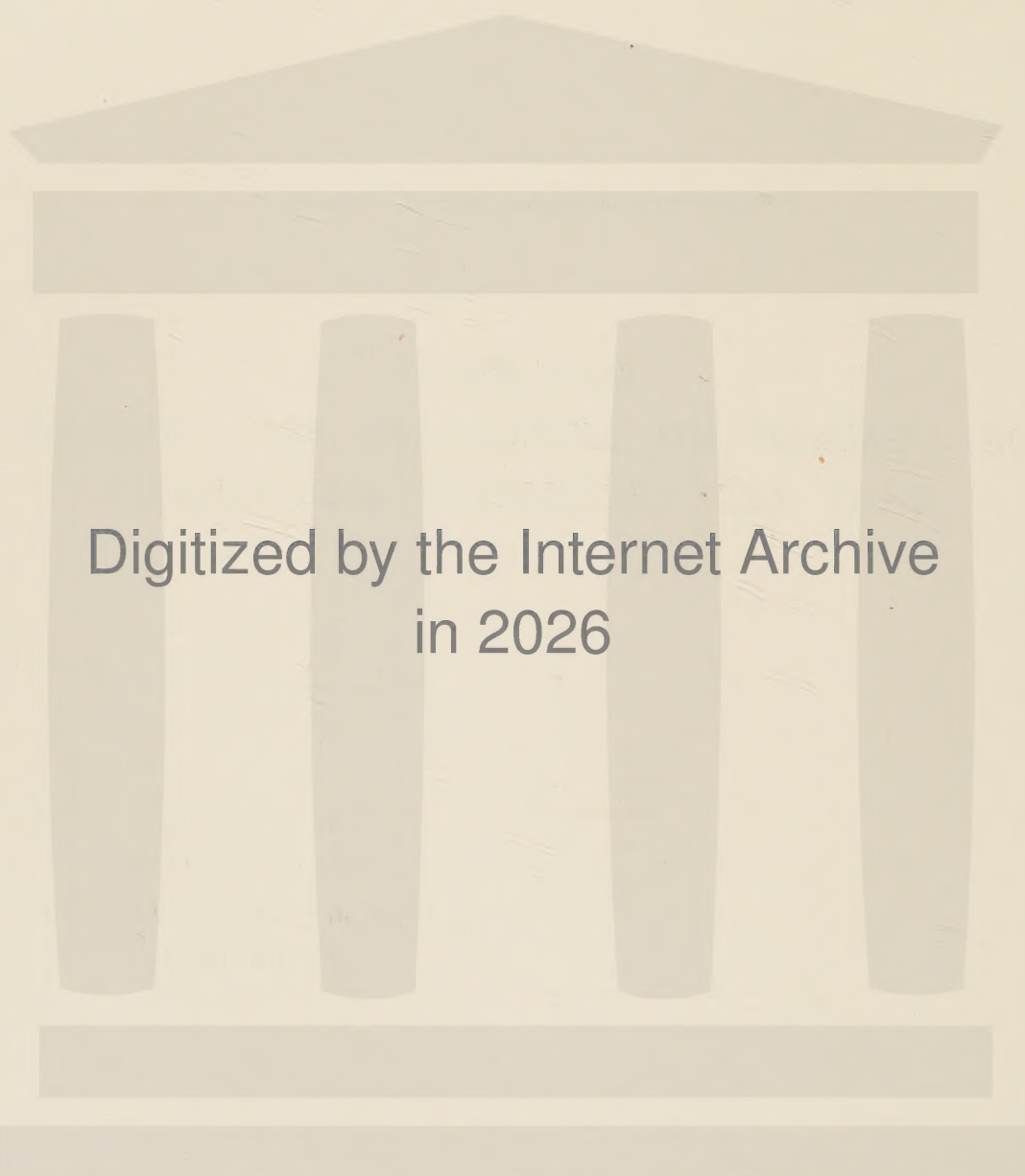
Le Doyen de la Faculté des Sciences,

A. CHATELET.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN SARRAILH.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552427_0013

SÉRIE A, N° 2352

N° D'ORDRE : 3124

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Joseph STOLKOWSKI

1^{re} THÈSE. — Essai sur le déterminisme des formes minéralogiques du calcaire
chez les êtres vivants (Calcaires coquilliers).

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 7 octobre 1950, devant la Commission d'examen.

MM. A. PRENANT,	<i>Président.</i>
R. WURMSER,	} <i>Examineurs.</i>
P. JOB,	

MASSON & C^{ie}, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS (VI^e)

1950

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen M. A. CHATELET.

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	PIVETEAU	T	Géologie.
A. DENJOY ...	T	Théorie des Fonctions.	ROCARD	T	Physique.
L. LUTAUD ...	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	H. CARTAN ...	T	Mathématiques générales.
E. DARMOIS ..	T	Enseignement de Physique.	SCHAEFFER ...	T	Physiol. des fonctions.
ROBERT LÉVY. T		Physiologie comparée.	LAFFITTE	T	Chimie générale.
HENRI VILLAT. T		Mécanique des fluides et applications.	FAVART		Calcul des probabilités et Physique-Mathémat.
M ^{me} RAMART-LUCAS..	T	Chimie organique.	COULOMB	T	Physique du globe.
FOCH	T	Mécanique physique et expérimentale.	M ^{lle} COUSIN... T		Biol. anim. (P. C. B.).
PAUTHENIER ..	T	Electrotechnique générale.	CHRÉTIEN ...		Chimie (P. C. B.).
DE BROGLIE ..	T	Théories physiques.	DRACH		Zoologie.
JOB	T	Chimie générale.	KASILER		Physique.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.	CHATELET T		Arithmétique et Théorie des nombres.
COMBES	T	Physiologie végétale.	EPHRUSSI T		Génétique.
GARNIER	T	Géométrie supérieure.	WURMSER T		Biologie phys.-chimique
PÉRÈS	T	Mécanique rationnelle.	BAUER	T	Chimie-Physique.
HACKSPILL ...	T	Chimie minérale.	RIVIÈRE		Géologie (P. C. B.).
LAUGIER	T	Physiologie générale.	GAUTHERET ...		Biol. végét. (P. C. B.).
TOUSSAINT ...	T	Technique aéronautique.	LUCAS		Physique.
M. CURIE	T	Physique (P. C. B.).	A. THOMAS... ..		Evolut. des êtres organ.
G. RIBAUD ...	T	Hautes températures.	ARNULF		Optique appliquée.
CHAZY	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.	MAX MORAND..		Physique.
CROZE	T	Physique théorique et Physique céleste.	SOLEILLET ...		Physique.
DUPONT	T	Théories chimiques.	FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.
VALIRON	T	Calcul différentiel et Calcul intégral.	DANJON	T	Astronomie.
BARRABÉ	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.	FROMAGEOT ..		Chimie biologique.
VAVON	T	Analyse et mesures chimiques.	LAPORTE		Physiq. génér. et Radio activité.
G. DARMOIS ..	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	JANET		Mathématiques générales.
AUBEL	T	Chimie biologique.	PETIT	T	Biologie maritime.
Jacques BOURCART...		Géographie physique et Géologie dynamique.	QUENEY	T	Météorologie et Dynamique atmosphérique.
M ^{me} JOLJOT-CURIE...	T	Physique générale et Radioactivité.	GALLIEN		Biologie anim. (P. C. B.).
PLANTEFOL ...	T	Botanique.	EICHHORN		Biologie végétale (P. C. B.).
CABANNES	T	Recherches physiques.	DE CUGNAC ...		Biologie végétale (P. C. B.).
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés.	LAVAL		Physique (P. C. B.).
PRÉVOST	T	Chimie organique.	M ^{lle} CAUCHOIS..		Chimie-Physique.
BOULIGAND ...	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	THELLIER		Physique du globe.
CHAUDRON ...	T	Chimie appliquée.	AUDUBERT		Electrochimie.
WYART	T	Minéralogie.	L'HÉRITIER ...		Génétique.
TEISSIER	T	Zoologie.	GRIVET	T	Radio-Electricité.
MANGENOT ...	T	Biologie végétale.	PONCIN		Mécanique des fluides.
P. AUGER	T	Physique quantique et relativité.	THIRY	T	Mécanique appliquée.
MONNIER		Physiologie générale.	DUBREIL		Mathématiques générales.
			QUELET		Chimie (P. C. B.).
			CAGNIARD		Géophysique appliquée.
			CHAMPETIER ..		Chimie appliquée.
			CUVILLIER		Géologie structurale et Géologie appliquée.
			JUNG		Pétrographie.
			TRILLAT		Physique (P. C. B.).
			WIEMANN		Chimie (P. C. B.).
			LÉCHNÉROWIEZ.		Mathématiques.
			JACQUINOT ...		Physique (P. C. B.).
			VASSY		Physique de l'atmosphère.
			DESTOUCHES...		Théories physiques.

Secrétaire CH. MONIER.



ESSAI SUR LE DÉTERMINISME
DES
FORMES MINÉRALOGIQUES DU CALCAIRE
CHEZ LES
ÊTRES VIVANTS (CALCAIRES COQUILLIERS)

par

JOSEPH STOLKOWSKI,
Professeur agrégé de l'Université.

*A mes parents.
A ma famille.*

TABLE DES MATIÈRES

PRÉFACE	2
INTRODUCTION	4
PREMIÈRE PARTIE : ORIENTATION DES RECHERCHES	
<i>Chapitre Premier. — HISTORIQUE</i>	5
L'aspect minéralogique du problème (p. 5). — L'aspect biologique du problème (p. 11).	
<i>Chapitre II. — RÉVISION DES DONNÉES DU PROBLÈME.....</i>	14
I. <i>La structure minéralogique des coquilles</i> : Les techniques d'étude (p. 14). — Les résultats (p. 27).	
II. <i>Peut-on attribuer à des facteurs chimiques ou physico-chimiques le déterminisme des formes minéralogiques du calcaire ?</i> Rôle du pH (p. 30). — Rôle des traces de certains métaux (p. 32). — Conclusion (p. 33).	

DEUXIÈME PARTIE

L'INTERVENTION DE L'ANHYDRASE-CARBONIQUE DANS LES PHÉNOMÈNES
QUI ABOUTISSENT A LA FORMATION DES COQUILLES
EST LA CAUSE ESSENTIELLE DU DÉTERMINISME DES FORMES MINÉRALOGIQUES
DU CALCAIRE CHEZ LES MOLLUSQUES

<i>Chapitre Premier. — L'ANHYDRASE-CARBONIQUE</i>	33
<i>Historique</i> (p. 33). — <i>Mise au point d'une nouvelle technique de mesure</i> (p. 40).	
<i>Description de l'appareil</i> (p. 40). — <i>Les modalités d'utilisation</i> (p. 43). — Choix d'une méthode de mesure (p. 43). — Détermination de k_0 (p. 44). — Influence de la vitesse d'agitation (p. 47). — Pression du gaz dégagé et constante de vitesse (p. 50). — Influence de la viscosité sur la constante de vitesse mesurée (p. 51). — Evaluation des activités anhydriques (p. 52). — Etalonnage de l'appareil (p. 52).	
<i>Chapitre II. — L'INTERVENTION DE L'ANHYDRASE-CARBONIQUE DANS LA FORMATION DE LA COQUILLE DES MOLLUSQUES EST POSSIBLE</i>	55
Action d'un inhibiteur de l'anhydrase, le benzène-sulfamide, sur la régénération des coquilles d' <i>Helix</i> (p. 55). — Variations de la teneur anhydrique du manteau d' <i>Helix aspersa</i> (Müll.), en fonction de la saison (p. 57).	
<i>Chapitre III. — L'ANHYDRASE-CARBONIQUE INTERVIENT DANS LE DÉTERMINISME DES FORMES MINÉRALOGIQUES DU CALCAIRE</i>	61
<i>Distribution de l'anhydrase-carbonique dans le manteau des Mollusques à coquilles calcitique et aragonitique</i> (p. 61). — <i>L'influence du milieu sur l'anhydrase-carbonique et la forme minéralogique du calcaire des coquilles</i> (p. 65). — Inhibition de l'anhydrase-carbonique par l'eau de mer (p. 65). — Influence du liquide extrapalléal et du sang de quelques Mollusques sur l'anhydrase-carbonique (p. 72). — Rôle du <i>periostracum</i> (p. 74). — <i>Les transformations possibles de l'enzyme et leurs incidences sur la formation du calcaire</i> (p. 76). — <i>Notes et tableaux annexes</i> (p. 81).	

TROISIÈME PARTIE

ESSAI SUR LE MÉCANISME DE LA FORMATION DE L'ARAGONITE
DES COQUILLES

1. La vitesse de départ du CO_2 d'une solution de bicarbonate de calcium influence-t-elle la forme minéralogique du calcaire déposé ?	93
2. Action de l'anhydrase-carbonique, <i>in vitro</i> , sur quelques solutions minérales	95
3. Discussion	98
RÉSUMÉ ET CONCLUSION	101
BIBLIOGRAPHIE	103

PRÉFACE

Les principales recherches qui font l'objet de cet exposé ont été réalisées au Laboratoire de Zoologie de l'Ecole Normale Supérieure et au Laboratoire d'Anatomie comparée de la Faculté des Sciences de Paris. Elles sont le résultat de quatre années de travail.

J'ai été, il y a plus de dix ans, l'élève de MM. ROBERT LÉVY et MARCEL PRENANT, Professeurs à la Faculté des Sciences de Paris. Je suis maintenant leur disciple. Je dois à M. ROBERT LÉVY l'essentiel de ma formation expérimentale; à M. MARCEL PRENANT, le sujet passionnant qui est le titre de cet ouvrage, et des idées générales qui, pour ne pas

avoir été publiées, n'en sont pas moins venues renforcer et éclairer les mises au point que l'expérience m'a conduit à faire. Je dois à mes deux maîtres l'amour de la précision et de l'objectivité; je les prie de croire à mon respect et à ma profonde reconnaissance.

C'est au Laboratoire de Chimie C de la Sorbonne que j'ai effectué la partie chimique de ce travail. J'y ai reçu, de M. le Professeur PAUL JOB, l'accueil le plus large qu'un ancien élève pouvait en espérer. J'ai trouvé auprès de lui la même bienveillance et les mêmes conseils que les travailleurs de son laboratoire. Qu'il veuille bien agréer l'expression de ma gratitude.

MM. les Professeurs MAUGUIN et WYART m'ont autorisé, dès le début, à user des ressources du Laboratoire de Minéralogie de la Sorbonne. J'ai pu, grâce à eux, entrer en relation avec les spécialistes de rayons X les plus qualifiés; je m'étais d'abord initié à cette technique dans le laboratoire de M. JOB, sous le contrôle de M^{lle} STORA. Je ne saurais oublier l'obligeance dont elle a fait preuve à mon égard, ainsi que ses collaborateurs, M. MARTIN, Ingénieur-Conseil à la S. N. C. F., et M. HELLER. Les circonstances m'ont conduit par la suite à connaître, sous le patronage de M. WYART, M. MARCEL CHATELET, Chef de Travaux à l'Institut de Chimie de Paris. J'ai utilisé, pendant des mois, un appareil à rayons X dans cet établissement. M. CHATELET, qui n'a jamais ménagé, au service des chercheurs, ni sa peine, ni son temps, l'avait mis à mon entière disposition. Je suis heureux de lui adresser, ainsi qu'à MM. MAUGUIN et WYART, tous mes remerciements.

M. RENÉ WURMSER, Professeur à la Faculté des Sciences, et M. JEAN ROCHE, Professeur au Collège de France, m'ont toujours reçu avec affabilité et ont bien voulu donner, à certaines de mes théories, la caution de leur autorité. Je les en remercie bien sincèrement.

Je voudrais pouvoir citer tous ceux qui m'ont fait profiter de leur expérience, lors de la mise au point d'une technique ou de la recherche d'un matériel : M. MONNIER, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris; M^{lle} LAGRANGE, du Laboratoire d'Hydrologie de la Sorbonne; M. ROSE, Chef de Travaux à cette même Faculté; MM. MEHRING, MORPAIN, BOIVIN, Ingénieurs au Service Central des Poudres; M. BRAUMAN et M^{lle} BRIGANDO, Assistants au Laboratoire de Chimie C; M^{me} WALTER-LÉVY, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Caen; MM. LEDERER et A. J. ROSENBERG, M^{lle} QUINTIN, Maîtres de Recherches; M. KURYLENKO, Chargé de Recherches au C. N. R. S.; M. CORDONNIER, Agent de laboratoire à l'I. C. P.; les travailleurs et techniciens des Laboratoires de Chimie C de la Sorbonne et de Zoologie de l'Ecole Normale Supérieure. Je les assure tous de ma reconnaissance. Je remercie également le C. N. R. S. dont les allocations m'ont permis de travailler, et M. FAURÉ-FRÉMIET, Professeur au Collège de France, qui a bien voulu parrainer ces recherches.

Je n'aurai garde enfin d'oublier ceux de mes anciens professeurs dont l'enseignement a le plus contribué à orienter ma culture et mes goûts : je songe surtout à M. LUCIEN PLANTEFOL, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, à qui je me fais un devoir et un plaisir de rendre hommage.

INTRODUCTION

Le problème du déterminisme des formes minéralogiques du calcaire est l'un de ceux que pose l'étude des formations calcaires chez les êtres vivants. Le calcaire existe sous quatre formes minéralogiques distinctes qui sont : la calcite, l'aragonite, la vaterite et le calcaire amorphe; la forme stable, qui devrait donc se former seule dans les conditions normales de température et de pression, est la calcite. Et pourtant, chez les animaux ou les végétaux dont les tissus sont calcifiés, on trouve fréquemment de l'aragonite et du calcaire amorphe.

MARCEL PRENANT (210) a donné, de l'existence du calcaire amorphe chez les animaux, une explication qui est toujours valable : c'est la présence du phosphate de calcium, en quantité suffisante, qui stabilise cette variété de calcaire, *in vitro* et *in vivo*. PRENANT a montré aussi que tous les calcaires biologiques n'avaient pas la même origine. En effet, le calcaire pur s'obtient *in vitro* dans 3 circonstances fondamentalement différentes : 1° par double décomposition, avec précipitation immédiate de CO_3Ca amorphe; 2° par double décomposition avec précipitation retardée d'un calcaire aussitôt cristallin; 3° par dissociation d'une solution de bicarbonate de calcium. Le premier cas correspond à la formation des carapaces de Crustacés. Le deuxième ne semble pas avoir d'application biologique. Quant au troisième, il correspond à la formation des coquilles de Mollusques, de Brachiopodes, de Cirripèdes et probablement à la formation des dépôts calcaires des polypiers d'Hexacoralliaires et d'Hydrocoralliaires.

C'est donc à cette troisième catégorie que s'applique le problème de l'aragonite : il est impossible, par dissociation du bicarbonate de calcium, à la température ordinaire, d'obtenir de l'aragonite pure, alors que de nombreuses coquilles, pour ne citer que ce genre de dépôts, en sont entièrement constituées ? La plupart des travaux effectués jusqu'alors avaient eu pour but de trouver une substance chimique susceptible par sa seule présence d'orienter la cristallisation du calcaire vers l'aragonite. Mais, comme PRENANT l'a constaté au cours de la mise au point qu'il a publiée dans le volume II (n° 4) des *Biological Reviews*, en 1927, si l'on a pu obtenir de l'aragonite pure *in vitro*, c'est dans des conditions que le biologiste ne peut prendre en considération. Et PRENANT en a conclu qu'il y avait, dans la matière vivante, des conditions spéciales, plus importantes que celles qui peuvent provoquer la formation de l'aragonite pure au laboratoire.

On verra dans les pages qui suivent que j'ai été amené, en présence de ce problème aux multiples aspects, à choisir un « fil directeur ». Mais il n'était pas dans mes intentions d'examiner tous les cas. Il y a des centaines d'espèces calcifiées; on peut avoir l'ambition de les passer en revue d'une manière détaillée : ce serait à vrai dire un travail d'encyclopédiste. Même dans le groupe d'animaux où je me suis cantonné, il eût été fastidieux, et inutile pour le but que je poursuivais, de tout observer. J'ai seulement cherché, en prenant quelques exemples caractéristiques, à connaître le phénomène essentiel.

Je me suis servi en toute occasion des techniques les plus adaptées aux recherches en cours, sans me préoccuper de la discipline scientifique dont ces techniques relevaient. Je

l'ai fait par nécessité, mais aussi, je l'avoue, pour satisfaire un penchant naturel; je n'ai pas eu à le regretter.

Je dois cependant rappeler les prévisions de MARCEL PRENANT, qui écrivait naguère que, pour « rechercher ce qui peut orienter la cristallisation vers l'aragonite ou la calcite quand le bicarbonate de calcium se dissocie », il fallait faire converger l'étude théorique, l'étude expérimentale et l'observation zoologique.

PREMIÈRE PARTIE

ORIENTATION DES RECHERCHES

CHAPITRE PREMIER. — HISTORIQUE

A. — L'aspect minéralogique du problème.

Quand j'ai commencé ce travail, en 1946, les minéralogistes admettaient qu'il existe: de la *calcite*, de l'*aragonite*, de la *vatérite*, du μ - CO_3Ca (dont l'autonomie était douteuse), du calcaire *amorphe*, toutes ces formes représentant les variétés du calcaire anhydre, et le *tri*, le *penta*, l'*hexahydrate de CO_3Ca* , qui représentaient les variétés du calcaire hydraté. A vrai dire, l'étude des hydrates n'avait pas été reprise depuis J. HUME (1925), cité par PRENANT (211).

A. — LES PROPRIÉTÉS DISTINCTIVES DES DIFFÉRENTES FORMES DE CALCAIRE

Je me contenterai d'indiquer, parmi les caractéristiques des diverses formes minéralogiques, celles qui sont indispensables à l'exposé de mes recherches; les autres, et plus spécialement les caractères optiques, sont détaillées dans les traités classiques de minéralogie auxquels il est facile de se reporter.

La *calcite* appartient au système *rhomboédrique*. On la rencontre en cristaux de formes diverses, possédant tous un axe morphologique ternaire. Elle peut aussi former des sphérolithes, généralement positifs, ou des spicules, chez les êtres vivants. Mais très fréquemment, pour cette variété comme pour l'aragonite, il n'y a pas de forme caractéristique discernable au microscope. Il faut, pour individualiser le minéral, avoir recours aux indications du microscope polarisant; la calcite est un minéral uniaxe négatif. Moins dure que l'aragonite, la calcite a aussi une densité plus faible : 2,71 contre 2,95 à l'aragonite. On y trouve souvent des macles. L'*aragonite* est *orthorhombique pseudo-hexagonale*; elle est biaxe négatif. Ses cristaux n'ont pas d'axe ternaire. Elle existe aussi sous forme de sphérolithes, généralement positifs, et de spicules, chez les êtres vivants. Les macles y sont fréquentes.

Le $\mu\text{-CO}_3\text{Ca}$ ne s'obtient qu'artificiellement : en plaques hexagonales, à faces planes ou marquées de six côtes rayonnantes. G. LUCAS [24, 1° et 2°] a montré, en 1947, que ces cristaux représentent en réalité de la vatérite bien cristallisée. On s'explique ainsi pourquoi les caractères du $\mu\text{-CO}_3\text{Ca}$ coïncidaient généralement avec ceux de la vatérite.

La *vatérite*. — HEIDE [20], VON OLSHAUSEN [32], et plus récemment FAIVRE [14], ont montré, par l'étude aux rayons X, que ce minéral appartient au système *hexagonal*. Sa densité varie entre 2,5 et 2,65. La vatérite se présente sous forme de sphérolithes qui peuvent être positifs ou négatifs. Mais on l'a aussi signalée en petites aiguilles.

Le *carbonate amorphe* est isotrope bien entendu. Sa densité est comprise entre 2,25 et 2,45.

Enfin l'*hexahydrate* est monoclinique. Sa densité est de 1,77. Il peut se présenter sous forme de prismes ou de tablettes monocliniques.

On ne connaissait qu'un procédé chimique pour distinguer d'une part la calcite, d'autre part l'aragonite et la vatérite : c'est celui que MEIGEN a indiqué et qui consiste à traiter les dépôts que l'on veut identifier par les sels de certains métaux lourds. J'y reviendrai. Mais il importe de souligner que les auteurs qui ont utilisé les réactions de MEIGEN, pour rechercher l'aragonite ou la calcite, ne se sont pas illusionnés sur la valeur de tels procédés et ne se sont prononcés qu'après avoir vérifié les résultats obtenus par d'autres moyens. Il est donc évident que les déterminations qui ont été faites de cette manière dans le règne animal, où les calcaires sont toujours mêlés de matière organique et d'impuretés, ne pouvaient être parfaites *a priori*. Le seul procédé précis de détermination est celui qui utilise les spectres de rayons X. Mais, depuis A. OSAWA (1) (1925), qui les a employés le premier, on les a fort peu appliqués aux calcaires biologiques.

La calcite, comme nous l'avons vu, est la forme *stable*, dans les conditions normales de température et de pression. Les autres formes, plus solubles, se transforment en calcite lorsqu'elles sont humides : le calcaire amorphe en quelques minutes, la vatérite et l'hexahydrate en quelques heures; ce sont là des formes instables de calcaire. Mais pour l'aragonite, forme métastable, la transformation peut durer des années.

A l'état sec enfin, il faut chauffer l'aragonite entre 400 et 500° pour provoquer sa transformation en calcite; la vatérite, à 300° (à 100° en présence d'eau). Selon HEIDE [20], on obtiendrait ainsi de l'aragonite aussi bien que de la calcite. Chauffé à 200°, le carbonate amorphe donne de la calcite. Quant à l'hexahydrate, il n'est stable qu'au-dessous de 0°.

B. — LA DISTRIBUTION DES DIFFÉRENTES FORMES DE CALCAIRE CHEZ LES ÊTRES VIVANTS ET SPÉCIALEMENT CHEZ LES MOLLUSQUES

Les dépôts calcaires sont caractérisés par la constance de la texture et de la forme minéralogique. On trouve toujours, en un point donné, chez une espèce déterminée, la même variété de calcaire, qui n'est fréquemment pas faite de calcite. C'est cela qu'il s'agit d'expliquer.

(1) Cité par PRENANT.

PRENANT (*loc. cit.*) a donné une liste détaillée de la distribution connue en 1927; il n'est donc pas nécessaire de la reprendre ici. Je rappellerai seulement que l'*aragonite*, assez répandue, forme la plupart des otolithes de Vertébrés, la coque des œufs de Tortue, les spicules des Ascidies de la famille des *Didemnidæ*, les tubes de *Gastrochæna* et d'*Aspergillum*; le dard de l'Escargot, le squelette des Hydrocoralliaires, des Hexacoralliaires et des « *Heliopora* » parmi les Octocoralliaires, celui des Eponges Astroclérides; on la rencontre aussi chez quelques algues calcaires (*Halimeda*, *Galaxaura*); enfin dans les coquilles de Mollusques.

CHEZ LES MOLLUSQUES. — Les spicules de Doris seraient des sphérolithes de *vatérite*, de même que ceux des *Doridæ* et des *Pleurobranchidæ*, les concrétions calcaires du conjonctif d'autres Gastéropodes et le contenu des glandes qui sécrètent l'épiphragme de l'Escargot.

Chez les Lamellibranches, les coquilles des *Ostreidæ*, des *Pectinidæ* et des *Inocérames* sont entièrement en calcite. Celles des *Unionides* sont entièrement en aragonite. Dans celles des *Aviculidæ*, des *Mytilidæ*, de *Trigonia*, la couche des prismes est en calcite, la nacre en aragonite. Il en serait de même chez les Hippurites. Chez les autres Lamellibranches, les coquilles semblent faites d'aragonite. Quant aux Prodissoconques, elles paraissent composées de calcite pour la plupart.

De nombreux Gastéropodes ont une coquille en aragonite. Mais, chez certains, il semble qu'il y ait aussi de la calcite. Les coquilles rudimentaires des Limaces et d'Arion sont en calcite, de même que celles de *Ianthina*, *Scalaria*, *Carinaria*. Selon LACROIX (cité par PRENANT), les coquilles de *Patella*, *Haliotis*, *Fusus*, seraient calcitiques à l'extérieur et aragonitiques à l'intérieur. La question est discutée pour les Ptéropodes. La coquille du Dentale est en aragonite, celle du Chiton et ses spicules également.

Chez les Céphalopodes actuels, toutes les coquilles sont en aragonite, sauf celle de l'Argonaute (qui est d'ailleurs très particulière).

Le tube de *Teredo* est en calcite, ainsi que le statolithe de *Pterotrachea*, les coques des œufs de : *Helix*, *Ampullaria*, *Bulimus*, *Amphidromus*. Cette liste, reprise en détail par BOGGILD [166] quelques années plus tard, n'a pas subi de modification. Notons seulement que BOGGILD a soigneusement étudié et classé les structures des coquilles. Il n'est pas possible de relier la présence de la calcite ou de l'aragonite à l'existence d'un type de structure : la Moule qui possède une couche supérieure de calcite et une couche inférieure d'aragonite a une structure « homogène » ; les *Aviculidæ*, qui sont en calcite, relèvent de la structure « prismatique » ; certaines *Ostreidæ* ont une structure « foliacée », d'autres une « Crossed lamellar Structure ». Un peu plus tard, F. K. MAYER [27, 28, 29], F. K. MAYER et E. WEINECK [30], qui travaillèrent en liaison avec le biologiste K. G. VON LEVETZOW [196], entreprirent d'étudier aux rayons X toute une série de coquilles de Mollusques et divers calcaires animaux. Selon ces auteurs, il existerait de la *vatérite* dans les régénérats des coquilles d'*Helix pomatia* (L.) et de *Planorbis corneus* (L.). Elle apparaîtrait la première et se transformerait progressivement en aragonite. MAYER, WEINECK et VON LEVETZOW n'ont pas envisagé la possibilité qu'il y ait d'abord une production de *vatérite* suivie d'une production d'aragonite. S'appuyant sur les deux exemples cités, MAYER s'est même permis d'émettre l'hypothèse que la *vatérite* pourrait bien être la forme première des dépôts de calcaire chez tous les Mollusques... !

Par ailleurs, MAYER précise que les concrétions calcaires du parenchyme des Cestodes, dans lesquelles PRENANT avait cru discerner de la vaterite, sont faites en réalité de calcite, comme SCHMIDT [33] l'avait affirmé. Les tubes de *Serpules* seraient en aragonite. Les spicules de *Doris tuberculata* contiendraient de la vaterite, mais mélangée d'aragonite. MAYER donne enfin une liste des déterminations réalisées en utilisant concurremment la mesure du poids spécifique des cristaux, la réaction de MEIGEN et les rayons X. Malheureusement, il n'a pas précisé à quel endroit de la coquille il avait fait ses prélèvements : par exemple, il indique pour *Mytilus edulis* une composition calcitique. Il est bien évident qu'il s'agit de la couche extérieure de la coquille, car la nacre est en aragonite, sans contestation possible. Il était donc prudent de ne pas utiliser aveuglément ces résultats. Il reste à ajouter que M^{lles} P. HILTZ et T. POBEGUIN (*C. R. Ac. Sc.*, 228, 1949, pp. 1049-51) ont montré que les cystolithes de *Ficus elastica* sont formés d'une trame cellulosique, qui constitue la substance fondamentale au sein de laquelle précipite du carbonate de calcium amorphe, stabilisé par la précipitation concomitante d'une faible quantité de silicate de Ca (qui joue ainsi le même rôle qu'a le phosphate de calcium dans le règne animal).

c. — LES CONDITIONS D'OBTENTION, *IN VITRO*, DES FORMES INSTABLES DE CALCAIRE

Les difficultés que l'on a éprouvées dès le début des recherches sur le polymorphisme du calcaire, il y a plus d'un siècle, pour expliquer le dépôt des formes instables de calcaire, avaient conduit les auteurs à se préoccuper des conditions d'obtention de ces formes *in vitro*. Ces travaux, qui se sont poursuivis de nos jours, présentent par ailleurs un intérêt documentaire intrinsèque.

La « forme μ » s'obtient par double décomposition entre deux solutions qui diffusent lentement (LUCAS, *loc. cit.*), ou par dissociation du bicarbonate de calcium entre 30 et 60°; elle est alors mêlée à de l'aragonite et à de la calcite. Nous avons vu que la forme μ s'identifie à la *vaterite*. Celle-ci se prépare, selon la méthode de FAIVRE (*loc. cit.*), par double décomposition entre du CO_3Na_2 et du CaCl_2 à 30° exactement, en solution alcoolique.

Le calcaire amorphe se produit fréquemment quand on mélange à concentration élevée des solutions de sels de calcium.

L'*hexahydrate* se fait à basse température, de préférence au voisinage de 0°, jusqu'à 10° dans une solution sucrée. VETTER [268, 2°] a montré que la sursaturation en bicarbonate, la présence de carbonate d'ammonium et l'absence de formes plus stables sont des facteurs favorables à sa formation. Il n'est pas certain que l'hexahydrate se trouve dans la matière vivante, bien que des biologistes l'aient obtenu artificiellement à partir de calcaires amorphes.

L'*aragonite*. On ne peut la préparer *in vitro*, à la température ordinaire. Je n'insisterai pas sur le détail des discussions par lesquelles chimistes et minéralogistes ont tenté d'expliquer la formation de l'aragonite : PRENANT les a suffisamment commentées. Je rappellerai seulement que la dissociation du bicarbonate de calcium fournit, au-dessous

de 30°, de la calcite pure, un mélange de calcite et d'aragonite au-dessus de 30°, avec prédominance de l'aragonite à 70°, et formation de cette aragonite, seule, à 90° (KENDALL [247]); par double décomposition du chlorure de calcium et du carbonate de sodium, FAIVRE [14] a montré dernièrement que l'aragonite pure se forme à 60°. De toutes façons, ces températures ne sont qu'exceptionnellement compatibles avec la vie. Les carbonates isomorphes de l'aragonite (CO_3Sr , CO_3Ba , CO_3Pb) peuvent orienter la précipitation du calcaire vers l'aragonite dans une solution de bicarbonate de Ca, à condition de s'y trouver en quantité suffisante. Mais les cristaux d'aragonite eux-mêmes ne semblent pas avoir d'influence sur la formation d'aragonite nouvelle; de plus, VATER [267] a obtenu des calcites en présence de 16 % de CO_3Ba . La teneur en carbonates isomorphes n'est donc pas décisive. Elle semble toutefois plus efficace à l'état naissant.

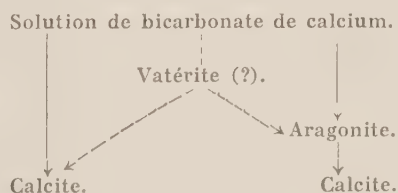
La concentration des solutions, « l'équilibre des carbonates » en solution, les sels d'ammonium ne sont pas non plus des facteurs que l'on peut prendre en considération. Le sulfate de Ca, à condition qu'il y en ait une quantité suffisante dans la solution mère, semble favoriser la production d'aragonite. Mais l'analyse des calcaires animaux prouve que cette condition n'est pas réalisée chez les être vivants.

On constate par contre, d'une manière générale, que les calcites biologiques sont riches en sels de magnésium et que les aragonites en sont pauvres. Mais on ne peut mettre en évidence, *in vitro*, la moindre influence des sels de Mg.

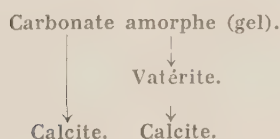
Je citerai encore une remarque de PRENANT qui notait, en 1927, que les Crustacés d'eau douce ont une faible teneur en magnésium, alors que les autres Crustacés, dont la carapace est faite également de calcite, de calcaire amorphe ou de vatérite, en ont bien davantage.

Par conséquent, aucun des facteurs étudiés jusqu'ici ne pouvait expliquer de manière satisfaisante la présence de l'aragonite dans les calcaires animaux. PRENANT reprit le problème d'un point de vue théorique. Il s'efforça d'établir une relation entre la teneur en (Ca^{++}) des solutions de sels de calcium, la concentration en ions H^+ et la pression, en ces solutions, du CO_2 . Ses calculs, traduits en graphiques, lui permirent de distinguer 3 régions dans chacune desquelles on peut exprimer par un schéma les filiations possibles entre les diverses formes de calcaire.

Dans la région I :

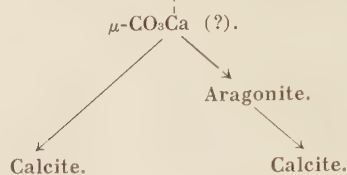


Dans la région II :

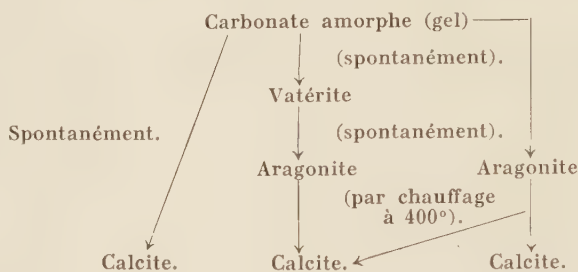


Dans la région III : (cette région n'aurait pas d'application biologique) :

Solution sursaturée de bicarbonate de Ca.



Ces conclusions s'opposaient à celles de LINCK (« Ueber die Bildung des Kalksteine ». *Naturw. Wochsch.*, 8, 1909), qui présentait différemment les relations génétiques entre les calcaires :



PRENANT conteste formellement que le carbonate amorphe soit à l'origine de tous les calcaires; qu'il puisse donner de l'aragonite dans des conditions simples, et que l'aragonite soit un stade intermédiaire nécessaire entre la vatérite et la calcite, si même, dans des conditions simples, elle peut être un intermédiaire entre elles.

MAYER (*loc. cit.*), de son côté, affirma que le schéma donné par LINCK restait valable dans son ensemble. Il assignait cependant aux différents calcaires une origine vatéritique. FAIVRE (*loc. cit.*) a montré, en 1945, que l'ordre de précipitation des 3 formes de CO_3Ca , si l'on fait abstraction de l'influence perturbatrice du CO_2 , est bien celui que laissent prévoir les considérations thermodynamiques : vatérite, aragonite, calcite; mais il s'agit là, évidemment, d'un point de vue un peu différent de celui de MAYER, LINCK et PRENANT discutaient. R. FAIVRE cependant, en collaboration avec R. WALLAEYS, vient de démontrer que la vatérite pure, en solution aqueuse, peut donner naissance à un mélange de calcite et d'aragonite [14 bis]; mais la formation de l'aragonite succède à celle de la calcite. Les proportions varient avec la température. On peut même obtenir une transformation totale de « vatérite naissante » en aragonite pure, en présence d'eau distillée, dégazée et maintenue à 60°. Ces conditions ne sont pas simples et ne sauraient se rencontrer *in vivo*. Comme j'aurai d'autre part l'occasion de contester les résultats de MAYER, il me semble raisonnable de conserver, dans leur ensemble, les schémas donnés par PRENANT.

Il n'avait donc pas été possible, par des recherches portant sur des solutions purement minérales, de trouver une réponse à la question posée. Il était désormais évident que le problème de l'aragonite était un problème biologique. Dans cet ordre d'idées, P. MANIGAULT [198], le premier, avait pensé à l'action d'une diastase, et avait entrepris de relier la présence, absolument générale, de la phosphatase alcaline dans le manteau

des Mollusques à la forme minéralogique du calcaire déposé par ces animaux. Mais il avait échoué.

Pourtant, si l'on considère que l'aragonite ne se forme pure, *in vitro*, par dissociation du $(\text{CO}_3\text{H})^2\text{Ca}$, qu'à 90°, il est normal d'envisager qu'une diastase peut réaliser le même phénomène, *in vivo*, à la température ordinaire. Mais cette diastase doit agir spécifiquement sur les bicarbonates, sur le bicarbonate de calcium en particulier. Précisément, on connaît, depuis 1931, l'*anhydrase-carbonique* qui favorise la dissociation du CO_3H_2 et le départ du CO_2 de ses solutions. Il était donc tout naturel d'expérimenter pour répondre d'abord à la question suivante : l'intervention de l'anhydrase-carbonique peut-elle expliquer le déterminisme des formes minéralogiques du calcaire chez les êtres vivants ?

Poser cette question, c'était en même temps lui assigner des limites. En effet, si l'anhydrase intervient, cela ne peut être que dans les sécrétions qui contiennent du bicarbonate de calcium, et nous avons vu que ces dispositions ne sont pas réalisées dans tous les groupes d'animaux. Il était donc indiqué de prendre comme matériel d'étude : les *Mollusques*, qui sont remarquables par le nombre et la variété des cas que l'on y rencontre, et que l'on peut se procurer sans trop de difficultés.

Dans ces conditions, on ne pouvait entreprendre de travailler sans faire le point de nos connaissances sur les modalités de formation de la coquille.

B. — L'aspect biologique du problème chez les Mollusques.

On sait depuis fort longtemps que la coquille des Mollusques est formée de 3 parties : de l'extérieur vers l'intérieur, une membrane très mince, le periostracum, intimement fixée à la couche des prismes sous-jacente; celle-ci est formée de prismes calcaires, de section polygonale, disposés normalement à l'épiderme de manière générale. Enfin la nacre, composée d'assises horizontales alternativement constituées de couches organiques et calcaires. Son épaisseur va en diminuant de la charnière à la marge des coquilles où elle vient mourir à quelque distance de l'extrême bord de chaque valve, laissant ainsi un espace où seule la couche des prismes est en contact avec le manteau du Mollusque. Le periostracum est constamment relié au manteau dans un repli duquel il prend naissance (fig. 1, A et B).

Cette description classique est celle qui a été faite par MOYNIER DE VILLEPOIX [200, 201, 202].

Prenant comme premier exemple l'Anodonte, M. DE V... remarque que le manteau n'est relié au test qu'en quelques points bien déterminés, notamment par les muscles palléaux qui courent parallèlement à la marge du manteau, à quelque distance des bords de la coquille. Dans ces conditions, il existe à l'état normal une double cavité complètement close de toutes parts, limitée sur les bords par le periostracum et le ligament, et dont le plafond est formé par la coquille, le plancher par le manteau lui-même. Et M. DE V... ajoute : « A l'état normal, aucune communication ne saurait donc exister entre cette cavité et le milieu ambiant. » Cette disposition (fig. 1, C et D) est, dans ses traits fondamentaux, « commune à presque tous les Lamelli-branches, Ostracés et Pectinides exceptés » (chez ceux-ci, il semble que le manteau soit *libre* dans le milieu ambiant).

La couche des prismes possède, à sa base surtout, des cloisons transversales de conchyoline; d'autre part chaque prisme est entouré d'une gaine de matière organique, placée perpendiculairement à la surface du periostracum et en connexion intime avec lui.

La couche de nacre diffère de la précédente par sa structure feuilletée et l'abondance de la conchyoline. G. RANSON (Titres et travaux, Masson, 1943), a pu ajouter quelques précisions à ces notions classiques. Il a également décrit, chez les Huîtres, une « couche crayeuse » qui serait le produit du « mucus calcaire » sécrété par l'épithélium palléal.

MOYNIER DE VILLEPOIX a définitivement démontré l'inanité de l'ancienne théorie de « l'intussusception », aux termes de laquelle la coquille était douée de vitalité et pouvait s'accroître par elle-même. Pour MOYNIER DE VILLEPOIX, il n'est pas contestable que les substances coquillières proviennent de la sécrétion des cellules épithéliales du manteau : le periostracum est sécrété par les cellules glandulaires du fond du repli palléal

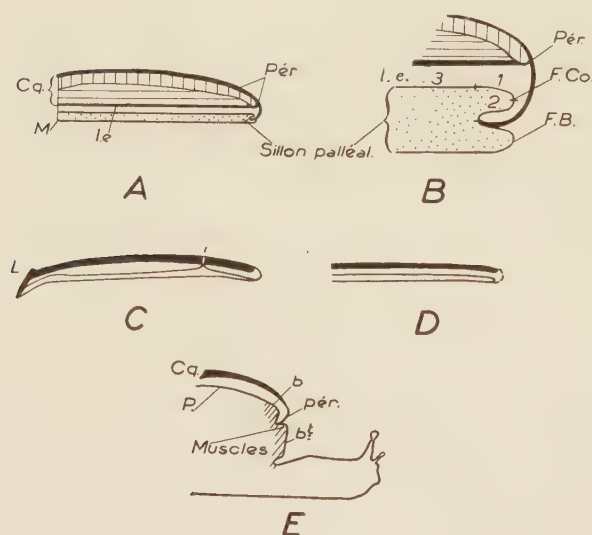


FIG. 1. — A. Composition schématique de la coquille des Mollusques et ses rapports avec le manteau. Cq., coquille; M., manteau; Pér., periostracum; l. e., liquide extrapalléal. — B. Structure schématique du sillon palléal. F. Co., feuillet conchylien; F. B., feuillet branchial; 1, zone épithéliale du F. Co. qui donne naissance à la couche des prismes; 2, zone épithéliale interne du F. Co.; elle épaissit le periostracum; 3, couche épithéliale supérieure du manteau; elle forme la nacre. — C. Rapports du manteau et de la coquille chez la Moule et l'Anodonte. I., insertion du manteau sur la coquille; L., ligament. — D. Les rapports du manteau et de la coquille chez *Gryphea angulata*. — E. Les mêmes rapports chez les *Helix*. Cq., coquille; P., poumon; b., bandelette palléale; pér., periostracum; bt, bourrelet palléal (qui contient les glandes calcaires et des glandes à mucus).

et son épaississement graduel s'effectue par les cellules de la face interne du feuillet conchylien de ce repli (cf. fig. 1, B). Les cellules de l'épithélium externe de ce même feuillet donnent naissance à la couche des prismes (fig. 1, B) (1). Quant à la nacre, elle est le résultat de la sécrétion des cellules épithéliales des flancs de l'animal.

Mais, en 1930, DE WAELE [225] montrait l'insuffisance de cette explication. M. DE V. n'avait pas tenu compte de l'existence du liquide extrapalléal que l'on trouve toujours entre le manteau et la coquille des Mollusques. Généralement il y en a très peu, mais chez l'Anodonte on peut en recueillir plus de 30 cm³ sur un même individu. DE WAELE prouva, par des analyses précises, que le liquide extrapalléal était du sang qui avait sans doute traversé le manteau en des endroits favorables, et qu'il contenait une albumine phosphocarbonatée dont la décomposition serait à l'origine des dépôts coquilliers. DE W... montra aussi que les phénomènes de cristallisation n'était pas les mêmes dans la cavité extrapalléale inférieure, limitée par le periostracum, et dans la cavité supérieure. Dans la première, l'eau extérieure diffuse à travers le periostracum. Dans la seconde (chez l'Anodonte), le liquide extrapalléal est parfaitement isolé du milieu.

La théorie de DE WAELE s'opposait donc à la théorie de M. DE VILLEPOIX. Sans doute

était-il exagéré de nier au manteau toute possibilité d'intervention dans la sécrétion de la coquille ? MANIGAULT (*loc. cit.*) entreprit d'utiliser les deux mémoires de manière synthétique. Il démontra que la phosphatase alcaline intervient dans la formation coquillière, et, après avoir étudié cet enzyme dans le manteau, M... admit implicitement que la sécrétion du manteau agissait sur le liquide extra-palléal. G. BEVELANDER et BENZER [164] devaient localiser, en 1948, la phosphatase alcaline au niveau de la bordure supérieure des cellules épithéliales du manteau, au contact, par conséquent, du liquide extrapalléal. Les conclusions de DE WAELE ne furent d'ailleurs pas acceptées par J. D. ROBERTSON [216], pour qui la protéine phosphocarbonatée postulée par DE WAELE n'a pas de réelle base chimique. Il faut donc faire intervenir les cellules du manteau (CROFTS, *in* ROBERTSON, 1929).

Mais de quelle manière peut-on concevoir cette intervention ? Il est certain que les cellules sécrétrices libèrent dans le liquide extrapalléal les produits qui donnent naissance à la coquille. Par conséquent, le véritable complexe « précalcaire » est le produit de sécrétion des cellules mêlé au liquide extrapalléal. Parmi ces produits, il est possible, sinon probable, qu'il y ait des diastases formées au sein des cellules; en particulier la phosphatase alcaline sans laquelle aucun dépôt calcaire ne pourrait se faire et dont on ne comprendrait pas qu'elle ne fût pas mêlée aux composés sur lesquels elle doit agir. Si donc l'anhydrase-carbonique intervient dans la formation des coquilles, il faudra admettre qu'elle est aussi entraînée dans le liquide extrapalléal par la sécrétion des cellules épithéliales du manteau.

Il serait intéressant, dans ces conditions, de connaître avec précision la composition du complexe « précalcaire ». Malheureusement, la seule conclusion que l'on puisse tirer des travaux qui viennent d'être cités, c'est que l'on ne connaît pas cette composition. On sait seulement qu'il se dégage du CO_2 à certaines époques et que le calcaire précipite aussitôt après. On sait aussi, si l'on s'en rapporte à RANSON, que le mélange « précalcaire » des prismes contient les mêmes éléments que celui de la nacre, avec en plus une substance organique dépourvue d'affinité pour le calcaire et semblable au périostacum. On peut donc penser qu'au moment où les protéines sont dénaturées et précipitent (peut-être par suite de l'action d'une protéase ?), les deux phases se séparent; l'une donne les fourreaux des prismes, l'autre les couches organo-calcaires transversales que nous avons décrites et qui sont en tous points comparables aux couches de nacre.

On a aussi remarqué (MANIGAULT, *loc. cit.*) qu'il y avait des noyaux de phosphate de calcium dans les coquilles; il est étonnant d'en trouver si peu dans des formations minérales qui dépendent étroitement d'une phosphatase; MANIGAULT avait pensé que le phosphate de calcium devait se former en plus grande quantité, mais être repris et solubilisé aussitôt après, sous l'effet d'un mécanisme inconnu. Pour BEVELANDER et BENZER (*loc. cit.*), qui retrouvèrent, dix ans après MANIGAULT, des résultats semblables sur *Pinna (Atrina rigida)*, le phosphate de calcium serait combiné à des ions organiques, combinaison qui en augmente la solubilité comme GREENWALD [239] l'a montré en 1938 (1); la phosphatase aurait pour rôle de transférer la majeure partie du phosphate à divers substrats, ce qui formerait un complexe susceptible de réenlever le phosphate de calcium. Quant au calcaire, il se déposerait par suite de l'altération de l'ion organique au cours d'une réaction d'oxydo-réduction.

(1) STENZINGER et PAULI [265] l'avaient démontré en 1929 pour le CO_3Ca .

Tout cela reste hypothétique; mais ces considérations ont le mérite de nous montrer en quoi la formation des coquilles est complexe, du seul point de vue chimique. Il est très probable, en l'état actuel des choses, que si du bicarbonate de calcium prend naissance dans les humeurs « précalcaires » (et chez les Mollusques *cela est démontré*), il provient d'un produit plus complexe sur la nature duquel il serait hasardeux de se prononcer. On peut donc penser qu'il se forme, au cours des dépôts coquilliers, du bicarbonate de calcium à « l'état naissant ».

Cette conclusion n'est pas un obstacle, au contraire, à l'hypothèse d'une intervention de l'anhydrase-carbonique. Il faut ajouter que l'idée d'une intervention diastasique était à la mode ces dernières années.

G. BRUNI [168], BRUNI et C. TROMBARA [169], qui effectuèrent quelques analyses de coquilles, avaient pensé que le déterminisme des formes minéralogiques du calcaire chez les Mollusques (1948) pouvait s'expliquer soit par l'intervention des *protéines* présentes dans le milieu, soit par l'action d'un « *catalyseur* ». Mais ce n'était là qu'un propos. Rien, dans le très modeste travail de ces auteurs, ne pouvait étayer ces idées. BRUNI et TROMBARA ont même émis des hypothèses de la plus haute fantaisie : pour ces deux chimistes, la calcite des coquilles se déposerait à des températures inférieures à 30°, et l'aragonite se formerait parce que l'animal évolue, lors de ce dépôt, dans des milieux dont la température est supérieure à 30°...!

De toutes façons, il fallait préciser le rôle de l'anhydrase-carbonique, puisque cela n'avait pas été fait. Mais avant d'expérimenter en ce sens, il était nécessaire de contrôler les résultats de MAYER, puisque seul, cet auteur affirmait avoir détecté de la vatérite dans les coquilles de certains Mollusques. Il fallait aussi s'assurer que les hypothèses jusqu'ici débattues pour expliquer la formation de l'aragonite pure *in vitro* n'étaient pas valables. Ce furent mes premières préoccupations.

CHAPITRE II. — RÉVISION DES DONNÉES DU PROBLÈME

I. — La structure minéralogique des coquilles.

A. — LES TECHNIQUES D'ÉTUDE

a) TECHNIQUES MINÉRALOGIQUES ET CHIMIQUES. — J'avais d'abord songé à utiliser le microscope polarisant et les réactions de MEIGEN pour distinguer les divers calcaires.

Comme je m'attendais à trouver de la vatérite dans certaines coquilles, je voulus m'assurer qu'on ne pouvait vraiment pas séparer l'aragonite et la vatérite par voie chimique. L'expérimentation devait se faire, bien entendu, avec des produits préparés dans des conditions aussi voisines que possible; la vatérite n'existant pas à l'état naturel, je dus également fabriquer de la calcite et de l'aragonite.

Je préparai la calcite en laissant évoluer à la température ordinaire un gel de calcaire obtenu par double décomposition entre du CO_2K_2 et du CaCl_2 en solutions concentrées (fig. 2, *a*); l'aragonite en faisant bouillir du bicarbonate de Ca (fig. 2, *b*) ou, de pré-

férence, en mélangeant à 60° une solution normale de CO_3K_2 et une solution normale de CaCl_2 ; ce dernier procédé donne des produits plus purs. En examinant les cristaux obtenus à diverses températures, je remarquai l'existence du $\mu\text{-CO}_3\text{Ca}$ des auteurs, entre 30° et 60° (fig. 3). J'ignorais alors que LUCAS y avait reconnu de la vatérite. Aussi bien ne pouvait-on recueillir facilement, dans ces conditions, une quantité de produits suffisante pour en faire l'étude aux rayons X. Il y avait deux méthodes possibles pour arriver à ce résultat : préparer une microvatérite, très instable (en solution), par double décomposition entre du CO_3Na_2 et du CaCl_2 à 30° (FAIVRE), ou laisser cristalliser un gel de calcaire à basse température, suivant un procédé antérieurement indiqué par HEIDE. J'adoptai cette dernière méthode, avec une petite modification : HEIDE mélangeait deux solutions, l'une de CO_3K_2 à 50 %, l'autre de CaCl_2 , 2N, après les avoir refroidies à 5°. Il se formait de la sorte un précipité gélatineux dont l'expérimentateur surveillait la cristallisation à la température ordinaire; puis il décantait.

Je mélangeai également deux solutions, de carbonate de potassium à 50 % et de chlorure de calcium 1,5 N ou 2 N, refroidies à 5° environ, mais j'abandonnai une nuit dans de la glace pilée le ballon qui contenait les liquides. Le gel qui s'est formé lors du mélange baigne ainsi dans une solution dont le pH est de 11,5. Il peut être nécessaire après ces opérations d'activer la cristallisation.

Il suffit alors de replacer le ballon au frigidaire, à une température de 8-9°. Il n'y a aucune précaution spéciale à prendre. On filtre ensuite et on lave à l'eau, puis à l'alcool. HEIDE obtenait, après 2 heures ou 2 heures 1/2, des sphérolithes de vatérite de 3 à 10 μ de diamètre. On recueille, en opérant comme je l'ai fait, des sphérolithes 5 fois plus gros, en grande quantité. On doit pouvoir faire mieux encore, mais il n'était pas indispensable à mes recherches de mettre au point tous les tours de main possibles. Je signalerai seulement qu'en mélangeant des solutions alcooliques, j'ai pu obtenir des sphérolithes de 1/10 de millimètre de diamètre (1). L'étude au microscope polarisant est évidemment facile à effectuer sur un matériel de ce genre; c'est pourquoi j'ai repris, en vue de les vérifier, les observations de HEIDE : les sphérolithes de vatérite sont entièrement transparents à l'état frais, ce qui les distingue des sphérolithes de calcite qui sont plus opaques. Les uns et les autres présentent la croix noire sphérolithique en lumière polarisée (fig. 5). Cette croix noire ne se dissocie pas sur les échantillons de vatérite qui ne sont pas en voie de transformation. La structure fibreuse radiale est de plus nettement visible en lumière polarisée. La biréfringence des sphérolithes est faible; l'allongement, positif pour la plupart de ceux que j'ai examinés, est négatif pour quelques-uns.

Si l'on abandonne des sphérolithes de vatérite entre lame et lamelle, avec un peu de la solution mère (solution alcoolique dans mes expériences), on observe, 24 heures plus tard, d'étranges figures de transformation (fig. 7, *a* et *b*). On peut suivre l'évolution des sphérolithes en formes diverses, qui rappellent parfois des ailes d'oiseaux et qui aboutissent finalement à des aiguilles en forme de croix dont les quatre branches seraient pourvues de ramifications secondaires.

La détermination au microscope polarisant n'est pas concluante, mais il semble cependant qu'il y ait de l'aragonite dans les cristaux observés. On remarque aussi

(1) LUCAS a obtenu de la vatérite cristallisée en monocristaux de 150 à 200 μ (forme $\mu\text{-CO}_3\text{Ca}$). Mais le problème des sphérolithes ne se confond pas avec celui des monocristaux, puisque les sphérolithes sont constitués par un assemblage de cristallites.

l'analogie qu'il y a entre les figures 2 *b* et 7 *b*. Après deux ou trois jours, on trouve aussi des rhomboèdres de calcite.

Sèche (fig. 6), la vatérite ne s'altère pas facilement. J'en ai gardé cinq ou six mois et LUCAS a signalé qu'il en a conservé bien plus longtemps, sans modification notable.

Après avoir étudié la vatérite *in vitro*, je songeai qu'il devait être possible de retrouver *in vivo* des sphérolithes semblables à ceux qui viennent d'être décrits. Bien entendu, je n'avais pas envisagé de les rechercher ailleurs que dans les coquilles. F. K. MAYER avait signalé de la vatérite dans les régénérats d'*Helix pomatia*. Je découpai donc un volet d'environ 1 cm² sur le dernier tour de spire de la coquille chez quelques *Helix*. Avec un peu d'attention, il est facile de ne pas léser le manteau. On peut distinguer des cristaux bien individualisés dans les régénérats. J'en repérai quelques-uns d'allure sphérolithique, qui donnaient la croix noire en lumière polarisée (fig. 8). J'en conclus que c'était la vatérite signalée par F. K. MAYER et K. VON LEVETZOW (*loc. cit.*), et je le remarquai, à titre documentaire, dans la note que j'ai publiée en 1947 [34]. Mais je dois revenir aujourd'hui sur cette opinion : comme j'ai déjà eu l'occasion de l'écrire, et comme je le montrerai dans les prochains paragraphes, je n'ai pas trouvé de vatérite dans les régénérats d'*Helix pomatia* après examen aux rayons X. Par conséquent, les sphérolithes dont il est question ne peuvent être de la vatérite; je ne puis savoir si ces sphérolithes sont faits d'aragonite ou de calcite, car leur faible dimension ne m'avait pas permis d'en faire une étude précise; mais, bien entendu, il s'agit de l'une ou l'autre de ces deux formes.

A l'aide de calcite, d'aragonite, de vatérite et de calcaire amorphe préparés, j'ai ensuite cherché à contrôler les réactions qui avaient permis jusqu'alors de distinguer l'aragonite et la calcite.

Il en existait deux essentiellement : celle qui utilisait le sulfate ferreux et celle qui utilisait le nitrate de cobalt en solution assez diluée. Si l'on fait agir du SO₄Fe en solution saturée sur une poudre de calcite, dans un verre de montre, on observe une légère coloration jaune; sur une poudre d'aragonite, surtout à chaud, le précipité devient vert, assez foncé. Avec le (NO₃)₂Co, en solution $\frac{M}{4}$ par exemple, on n'observe rien à froid avec la calcite, et, après un certain temps, à chaud, le précipité devient bleu pâle; avec l'aragonite à froid et surtout à chaud la poudre acquiert une teinte lilas.

On a décrit quelques variantes de ces deux réactions de MEIGEN. Par exemple, la modification de THUGUTT : on agite la poudre à examiner 1/2 minute avec une solution de nitrate d'argent 1/100 N, on lave à l'eau distillée et l'on fait agir un excès de bichromate de potassium en solution saturée. On obtient un précipité *rouge vif* de chromate d'argent avec l'aragonite. La calcite se teinte à peine ou prend une couleur légèrement rosée.

Si l'on opère sur des mélanges d'aragonite et de calcite, on n'obtient pas de résultat intéressant. J'ai utilisé des poudres qui contenaient : 5, 10, 15, 50, 85, 90, 95 % d'aragonite. Certes, il y a des différences de coloration d'un mélange à l'autre; mais les variations ne sont pas régulières, et de plus, un mélange à *x* % traité à 3 reprises différentes ne donne pas la même intensité de coloration à chaque fois. Ces expériences portaient sur des produits purs, de ceux que j'avais préparés, ou de spath d'Islande et d'aragonite naturelle. A plus forte raison était-il illusoire de les appliquer aux calcaires biologiques qui contiennent toujours des matières organiques et des impuretés. Je ne crois pas non plus qu'il soit souhaitable de généraliser l'application microscopique de

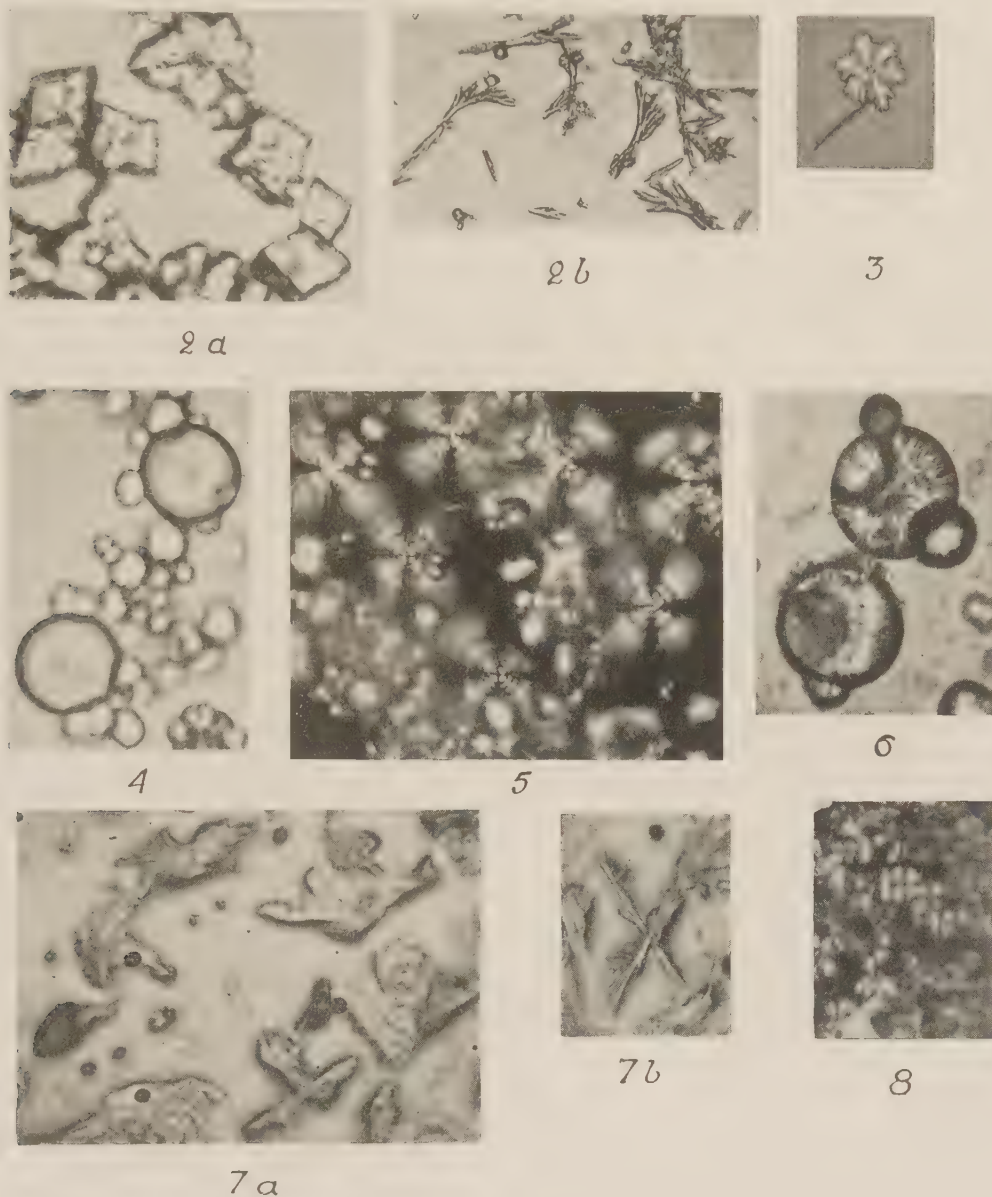


FIG. 2 a. — Cristaux de calcite vus au microscope.

FIG. 2 b. — Cristaux d'aragonite, mêlés de quelques rhomboèdres de calcite obtenus par ébullition de $(\text{CO}_2\text{H})^2 \text{Ca}$.

FIG. 3. — Vaterite cristallisée ($\mu\text{-CO}_2\text{Ca}$) avec une aiguille d'aragonite.

FIG. 4. — Vaterite fraîchement préparée, en sphérolithes de dimensions variées.

FIG. 5. — Sphérolithes de vaterite de 50μ en L. P. convergente. (Gross. : 400.)

FIG. 6. — Sphérolithes de vaterite de $1/10$ de mm, desséchés. L. N.

FIG. 7 a et b. — Transformations des sphérolithes de vaterite entre lame et lamelle, après 24 heures.

FIG. 8. — Fragment d'un régénérat de *Helix pomatia*. L. P.

la réaction de MEIGEN (modification de QUERCIGH) (*Lincei*, 5, 1915, pp. 24 et 1231), comme A. DEBENEDETTI-PISCHLER l'ont proposé (Klein-Strebinger-Forschritte der Mikrochemie, 1928, Deuticke Leipzig-Wien). Cela consiste à traiter le calcaire par $(\text{NO}_3)_2\text{Co}$ assez étendu. On rince, puis on ajoute du sulfure d'ammonium. L'aragonite devient très noire, la calcite tout au plus grisâtre. J'ai essayé, pour ma part, cette réaction sur des régénérats de coquilles, mais je n'ai pu en obtenir une détermination; l'espace-ment des cristaux qui se colorent séparément ne facilite d'ailleurs pas l'interprétation. A titre d'essai seulement, je pense qu'on peut utiliser la réaction de QUERCIGH sur les précipités massifs, intracellulaires. Il n'en demeure pas moins exact qu'on peut caractériser qualitativement la calcite, l'aragonite et même la vatérite, contrairement à ce que tous les auteurs en avaient dit. (HEIDE, VON LEVETZOW, PRENANT [*loc. cit.*]) : en effet, si l'on traite une poudre de calcite, une d'aragonite et une de vatérite par du nitrate de cobalt en solution assez étendue, on constate que la calcite ne donne rien, que l'aragonite acquiert une teinte rose, et que la vatérite devient *mauve violacée*, instantanément à froid et beaucoup plus brutalement à chaud, car dans ce cas elle devient presque violette. Avec moins de certitude, on peut même distinguer le calcaire amorphe (préparé par double décomposition et traité, aussitôt filtré, à l'alcool) des trois autres : à froid, le précipité est *mauve* et ce n'est que 10 à 15 minutes plus tard que cette couleur devient plus foncée et se rapproche de celle de la vatérite. A chaud, le précipité est franchement mauve et vire au « cyclamen » à la longue.

Par conséquent, sur des produits purs, avec de la vatérite sphérolithique telle que je l'ai obtenue, on peut légitimement utiliser la réaction de MEIGEN au nitrate de cobalt. Mais les couleurs caractéristiques sont celles qui apparaissent dans les minutes qui suivent la réaction. En effet, l'aragonite traitée au $(\text{NO}_3)_2\text{Co}$ à froid, prend aussi en 24 heures une teinte mauve violacée, moins intense cependant que celle de la vatérite. Si l'on fait bouillir de l'aragonite dans du nitrate de Co, le précipité mauve violacé se produit en quelques minutes.

Le sulfate de Fe ne donne pas de résultats aussi intéressants : la calcite devient jaune-ocre après le traitement, l'aragonite vert assez foncé, la vatérite vert très foncé; en laissant les produits se dessécher, la calcite a une teinte ocre, l'aragonite, rouille avec un liséré vert et la vatérite rouille-grisaille.

La réaction de QUERCIGH donne une coloration noire à l'aragonite et à la vatérite, un peu plus intense dans ce dernier cas.

On avait aussi préconisé autrefois l'emploi du rouge congo et de l'alizarine. Le rouge congo teinte un peu la calcite en rose; quant à l'aragonite et à la vatérite, elles deviennent rouges à la longue, l'aragonite un peu plus que la vatérite.

La réaction à l'alizarine est intéressante; les solutions d'alizarine sont jaune orangé. Elles ne donnent rien avec la calcite; une coloration mauve, bleutée, avec l'aragonite, mais pas instantanément; et une teinte violette, intense, immédiate, avec la vatérite.

On n'a jamais expliqué très clairement la réaction de MEIGEN. L'opinion généralement admise était qu'il se faisait entre le nitrate de cobalt et le calcaire, en solution, une « réaction chimique », simplement. Mais en examinant au microscope les précipités d'aragonite et de vatérite après la réaction, je constatai qu'ils ne semblaient pas altérés. Un produit coloré, amorphe, s'était seulement déposé entre eux. Les sphérolithes de vatérite n'avaient même pas perdu leur croix noire en lumière polarisée. La réaction ne devait donc porter que sur de faibles quantités de matière. La vatérite est plus soluble dans l'eau que l'aragonite et celle-ci plus que la calcite. Il était donc normal que la

réaction fût d'autant plus intense que le calcaire utilisé était plus soluble; mais il me parut possible d'envisager en même temps l'existence d'un phénomène d'adsorption, pour justifier la grande différence de comportement entre la vaterite et l'aragonite. Il suffisait, pour s'en assurer, de faire des colonnes de chromatographie en prenant comme adsorbant chacune des variétés de calcaire.

Pour opérer dans de bonnes conditions, on laisse les précipités deux jours au dessiccateur et 5 heures à l'étuve à 55°; après les avoir effrités entre deux feuilles de papier filtre, on tamise et on place la poudre homogène dans des colonnes de verre que l'on relie au même vide. On humecte avec 1/2 cm³ du solvant dont on se sert pour dissoudre les colorants utilisés et on verse des quantités équivalentes de ces préparations. Il faut évidemment choisir des produits qui n'altèrent pas le carbonate de calcium.

J'effectuai les premiers essais avec des colorants organiques : du paraminoazobenzène, du benzène-azonaphtol 2 (ou orangé-cérol 1) dans l'éther de pétrole, et un extrait d'ambre dissous dans un mélange d'éther et de chloroforme; le benzène-azonaphtol 2 n'a rien donné. Mais, avec le paraminoazobenzène, on obtient des résultats; la calcite ne donne rien, le liquide passe entièrement et garde sa couleur originelle. Avec l'aragonite, on observe une légère adsorption; la vaterite sépare une zone jaune orangé très nette. Le colorant filtre d'ailleurs plus lentement à travers la vaterite. Ces résultats se traduisent encore par la comparaison des quantités de liquide qui sont nécessaires au lavage des colonnes. 1 cm³ 1/2 suffit pour la calcite; pour l'aragonite, il faut 2 cm³ 1/2 et 5 cm³ pour la vaterite. L'extrait d'ambre contenait des pigments divers, notamment des porphyrines, qui sont assez fortement adsorbés sur l'alumine. Avec la calcite, rien ne s'est produit; avec la vaterite : le liquide versé, brun rougeâtre, d'apparence sale, a filtré clair et seulement rougeâtre, laissant une zone brune assez foncée à la surface supérieure de la colonne. Quant au calcaire amorphe, il présentait une certaine zone d'adsorption, mais moins bien délimitée que celle de la vaterite. Le carbonate de calcium précipité pur du commerce n'a rien donné.

Les mêmes expériences, enfin, effectuées avec du nitrate de cobalt dilué, ont donné les résultats qu'on pouvait en attendre : l'aragonite garde une teinte lilas, diffuse, et la vaterite sépare une bande mauve violacée, très intense. Dans les deux cas, le liquide qui filtre est incolore.

On peut donc affirmer que la vaterite possède un pouvoir adsorbant notable et l'aragonite un certain pouvoir adsorbant; le calcaire amorphe est à ce point de vue intermédiaire entre la vaterite et l'aragonite; la calcite est dépourvue de tout pouvoir adsorbant.

Cette mise au point comportait quelques conséquences : d'abord, concernant le mécanisme des phénomènes d'adsorption, les expériences qui viennent d'être relatées prouvent que la fixation des colorants ou des pigments sur l'adsorbant n'est pas consécutive à une réaction chimique, mais à une action physique, puisque la calcite, l'aragonite, la vaterite et le calcaire amorphe sont également du carbonate de calcium anhydre et ne se comportent pas de la même façon au cours des expériences. Les cristaux de forme régulière et arrondie seraient les plus efficaces. Dans cet ordre d'idées on doit admettre désormais que la réaction de MEIGEN n'est pas seulement une réaction chimique, mais qu'elle relève aussi de la chromatographie minérale.

On peut penser également avec quelque vraisemblance que les phénomènes d'adsorption se manifestent *in vivo* en présence des formations calcaires; certes, il n'y a rien

d'original dans cette affirmation. LERICHE et POLICARD [195] l'avaient soutenue en 1925, mais il restait à le prouver. On peut maintenant ajouter que cela se produit éventuellement avec la vatérite et le calcaire amorphe; cette dernière variété se trouve justement mêlée dans les os à un autre adsorbant, le phosphate de calcium. Enfin il serait intéressant de rechercher les pigments, les colorants ou les sels susceptibles d'être adsorbés sélectivement par la vatérite sphérolithique. Mais cela m'aurait entraîné bien loin du problème de l'aragonite; il me suffisait de l'avoir remarqué.

Il n'était donc pas possible de faire des déterminations précises par les procédés classiques; il n'était pas indispensable d'appliquer de nouveau ces procédés aux calcaires animaux, puisque l'on connaissait déjà le résultat possible d'un tel travail. Par contre, il pouvait être nécessaire de savoir évaluer dans un mélange le pourcentage de l'une des variétés présentes. Il ne restait plus, pour cela, qu'une technique utilisable: celle des rayons X.

b) TECHNIQUE CRISTALLOGRAPHIQUE: LES RAYONS X. — Quand on place un cristal sur le trajet d'un faisceau de rayons X, les plans réticulaires du cristal peuvent diffracter les rayons comme un réseau le fait pour la lumière. Les rayons diffractés, s'ils sont en concordance de phase, donneront, sur une pellicule photographique, des interférences faciles à repérer. Il faudra, pour cela, que soit respectée la relation de BRAGG:

$$n \lambda = 2 d \sin \theta,$$

dans laquelle θ représente l'angle du faisceau de rayons X avec le plan réflecteur, d la distance des plans réticulaires qui diffractent, λ la longueur d'onde du rayonnement, et n un nombre entier égal à 1, 2, 3...

Si l'on emploie une poudre assez fine, les rayons de longueur d'onde λ rencontreront toujours, parmi les milliers de petits cristaux orientés dans tous les azimuts, des facettes sur lesquelles ils pourront se réfléchir suivant un angle θ . Il y aura donc des interférences. Les rayons réfléchis formeront un cône de révolution de demi-angle 2θ . Il y aura autant de cônes que de familles de plans réticulaires.

La poudre est collée sur un bâtonnet de verre. Dans le procédé de DEBYE-SHERRER, ce bâtonnet est disposé suivant l'axe d'une chambre photographique cylindrique et peut tourner à l'aide d'un dispositif auxiliaire. Après une expérience, on observe sur la pellicule des raies de forme elliptique (intersection du cône des rayons réfléchis avec le film circulaire), qui se détachent sur un « fond continu » produit sur le film par des radiations secondaires.

En mesurant 2θ , l'intervalle qui sépare 2 raies symétriques, on peut évaluer d . En effet, 2θ correspond à un angle au centre de 4θ . La relation de BRAGG donne alors d , connaissant θ .

Dans le procédé de GUINIER, la poudre est placée sur la circonférence même de la chambre photographique, de sorte que l'intervalle entre les raies, 2θ , correspond à un angle au centre de 8θ . Si l'on utilise en plus un monochromateur pour filtrer le rayonnement (la radiation K de l'élément constituant l'anticathode est complexe et comporte 2 raies K_{α} et K_{β} ; le monochromateur élimine K_{β} et les radiations secondaires), on constitue une chambre à focalisation associée au monochromateur, qui présente certains avantages sur le DEBYE-SHERRER (fig. 9 et 10).

Je me suis toujours efforcé d'utiliser cette technique; j'avais à ma disposition un monochromateur à lame courbe, dont FAIVRE notamment a décrit les propriétés [14, 3°].

Les tubes à rayons X dont je me suis servi fonctionnaient entre 25 et 30 kV., et, suivant les modèles de haute tension, débitaient à 15 mA ou 5 mA. J'ai toujours opéré sur des anticathodes de Cu. La longueur d'onde du rayonnement K_{α} était donc de: $\lambda = 1,538 \text{ \AA}$. Les temps de pose ont varié avec l'état de cristallisation des produits examinés. En général, j'ai laissé les poudres bien cristallisées, 3 heures au DEBYE-SHERRER, 2 ou 3 heures au GUINIER.

Mais les précipités, dont je n'avais pas une quantité suffisante, ou les substances amorphes, sont restés exposés 10, 15 et même 24 heures au rayonnement.

Les chambres photographiques étaient du modèle le plus couramment employé : elles avaient 240 mm de circonférence.

Chaque spectre est caractérisé par l'intensité relative de ses raies, certaines (toujours les mêmes pour un corps déterminé) étant très intenses, d'autres l'étant moins. Il faut donc, pour identifier un cristal, connaître, avec les d qui lui sont propres, les intensités des raies correspondantes.

On connaissait bien l'aragonite et la calcite depuis les travaux de BRAGG et de WYCKOFF [40]; mais il n'en était pas tout à fait de même pour la vatérite, bien que

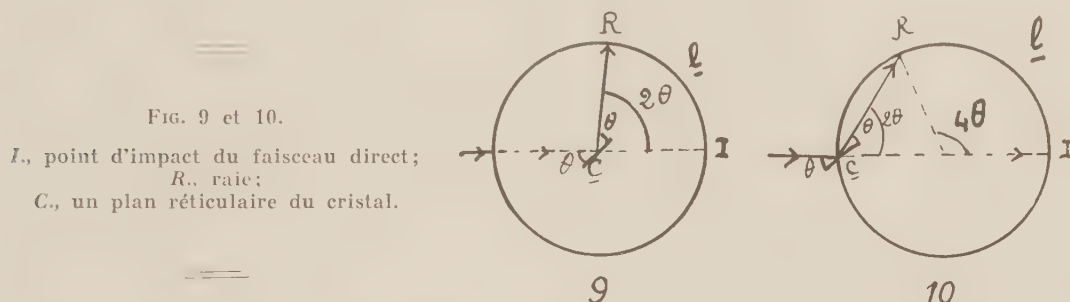


FIG. 9 et 10.

I., point d'impact du faisceau direct;
R., raie;
C., un plan réticulaire du cristal.

HEIDE (*loc. cit.*) et VON OLSHAUSEN (*loc. cit.*) en aient amorcé l'étude; VON OLSHAUSEN avait donné, de la maille du cristal, les dimensions suivantes : $a = 4,12 \text{ \AA}$; $c = 8,55 \text{ \AA}$. F. K. MAYER (*loc. cit.*) publia, quelques années plus tard, la liste des θ qu'il avait mesurés sur des clichés de vatérite préparés selon HEIDE et obtenus au D. S., avec une chambre de 57,3 mm de diamètre. Les d , calculés d'après la liste des θ donnés par MAYER, sont reproduits dans le tableau I.

TABLEAU I

s = schwach ; ss = sehr schwach ; m = mittel ; st = stark ; sst = sehr stark.

N ^{os}	Intensité	d	N ^{os}	Intensité	d
1.	s	3,65	13.	ss	1,41
2.	m	3,30	14.	m	1,35
3.	m	3,01	15.	ss	1,29
4.	st	2,70	16.	m	1,27
5.	ss	2,50	17.	ss	1,15
6.	st	2,27	18.	m	1,13
7.	st	2,04	19.	m	1,09
8.	ss	1,90	20.	s	1,02
9.	st	1,80	21.	ss	0,99
10.	st	1,63	22.	s	0,96
11.	s	1,52	23.	ss	0,92
12.	s	1,44	24.	ss	0,90

Récemment, R. FAIVRE (*loc. cit.*) s'est aussi intéressé à la question. Je dois à son obligeance la liste suivante des valeurs de d qu'il a obtenues sur une chambre à focalisation associée au monochromateur. Les intensités i ont été appréciées à l'œil. FAIVRE

confirme que la maille de la vatérite est hexagonale et donne, pour a et c les valeurs suivantes : $a = 4,14 \text{ \AA}$; $c = 8,44 \text{ \AA}$.

TABLEAU II

i	d	Interprétation (1)	i	d	Interprétation
3	4,22	0002	7	2,07	-
6	3,59	1010	4	1,86	1120
8	3,31	-	8	1,82	1122
10	2,74	1011	0	1,80	-
1	2,24	-	0	1,76	1014
2	2,11	1012	6	1,63	-
		1013			2020
		0004			-
					2021
					-
					2022

On remarque que le n° 6 de MAYER correspond à une raie forte, alors que le même d (2,27 d'une part, 2,24 d'autre part) correspond à une raie très faible chez FAIVRE. La raie n° 3 de MAYER, pour laquelle il note une intensité *moyenne*, coïncide avec la raie sensible de la calcite (dont le d est de : $3,04 \text{ \AA}$), ce qui prouve que la vatérite de MAYER contenait quelque peu de calcite. La raie n° 1, faible chez MAYER, est assez forte chez FAIVRE ($d = 3,59 \text{ \AA}$) qui lui donne la note 6/10.

Les mesures de FAIVRE portent sur les raies dont les θ vont jusqu'à 45° environ; je les ai complétées au D. S.. L'enregistrement au microphotomètre de quelques interférences m'a permis d'en apprécier les intensités relatives (i) (cf. tableau III).

TABLEAU III

Remarque : Dans les d , le premier chiffre après la virgule est seul significatif.

N°s	i	d	Interprétation	N°s	i	d	Interprétation
1.	0,142	4,22	0002	14.		1,31	-
2.	0,57	3,57	-	15.		1,28	2131
3.	1,00	3,30	1010	16.		1,23	-
4.	0,87	2,72	-	17.		1,19	2132
5.	0,091	2,29	1011	18.		1,17	-
6.	0,096	2,09	-	19.		1,14	3030
7.	0,053	2,04	1012	20.		1,10	-
8.	0,20	1,84	-	21.		1,06	3031
9.	0,54	1,80	1013	22.		1,03	-
10.	0,22	1,64	-	23.		1,01	3032
11.		1,55	1014	24.		0,97	-
12.		1,47	-	25.		0,96	2240
13.		1,36	2022	26.		0,94	-
			-				2241
			2023				-
			-				2243
			1124				-
			-				3142
			2024				-
							3143

(1) L'interprétation, c'est la désignation conventionnelle des plans réticulaires sur lesquels les rayons X se réfléchissent.

Il est difficile d'obtenir de la vatérite absolument pure: généralement, il s'y trouve une trace de calcite que j'estime à 0,5 %. Il y a également des traces d'impuretés diverses; la raie très faible de calcite, que l'on trouve à $d = 3,04$, est en réalité un doublet. De même, à $d = 2,19$, il existe une raie très faible qui n'appartient pas à un cristal du système hexagonal, comme le prouvent les abaques de HULL (qui permettent de repérer toutes les valeurs possibles dans un système cristallin donné). Je n'ai pas identifié ces traces qui ne pouvaient constituer un obstacle à l'utilisation de la vatérite dans les mélanges dont l'étude était indispensable à la poursuite de ce travail.

F. K. MAYER avait abordé le premier les recherches quantitatives. Il séparait des mélanges à 25 % près. COX et GOODWIN [12] reprirent le problème avec plus de précision. Ils opéraient sur des mélanges d'aragonite et de calcite. Ces auteurs réduisaient au minimum l'absorption des rayons X par le bâtonnet en utilisant des tubes très fins en verre de LINDEMANN (ce verre est constitué par du borosilicate de lithium). Les clichés étaient obtenus au D. S. avec monochromateur. On choisissait une raie de chaque composant, on en comparait l'intensité à celle d'une raie de l'autre composant.

Les interférences caractéristiques de chaque corps apparaissent sur le cliché d'autant plus nettement que le pourcentage du produit considéré est plus élevé dans le mélange et que le temps de pose est plus considérable. Les raies qui apparaissent les premières, et que l'on voit seules s'il y a peu de matière, sont les plus intenses, les plus sensibles parmi celles que l'on repère habituellement sur le spectre complet. Il faut donc choisir de préférence des raies intenses, et voisines en même temps, pour que les θ soient aussi semblables que possible. Pour la calcite, la raie dont le d est de $3,04 \text{ \AA}$ s'impose, tellement elle se distingue des autres par sa densité. La raie la plus proche, assez intense pour apparaître avec de faibles quantités, est, pour l'aragonite, celle dont le d est de $3,29 \text{ \AA}$. COX et GOODWIN confectionnaient toute une série d'étalons de composition variable. Quand ils avaient un échantillon à tester, il leur suffisait d'en prendre le cliché et de chercher l'endroit où celui-ci se plaçait dans la série précédente par l'intensité relative de ses raies. On arrivait ainsi à des résultats valables à 2 ou 3 % près, selon les auteurs.

FAIVRE (*loc. cit.*) opère sur une chambre à focalisation associée au monochromateur. Après avoir pris les clichés de quelques mélanges d'aragonite et de calcite, il enregistre au photomètre les interférences choisies pour la comparaison et trace une courbe, portant en ordonnée le rapport des intensités d'une variété à l'autre, et en abscisse les % de la composition correspondante. Quand on veut connaître la composition d'un mélange inconnu, il suffit donc d'en faire le cliché aux rayons X, d'enregistrer les raies choisies au microphotomètre et de porter sur la courbe, en ordonnée, le rapport des valeurs trouvées. On lit sur l'abscisse la composition cherchée. FAIVRE a montré qu'il pouvait détecter 0,5 % de calcite et 2 % d'aragonite dans un mélange; les dosages peuvent se faire par cette méthode à 2 % près, à 1 % dans certains cas particulièrement favorables.

On ne pouvait souhaiter meilleure méthode. J'adoptai donc la technique de FAIVRE, mais comme cet auteur ne l'avait appliquée qu'aux mélanges d'aragonite et de calcite, je refis ces expériences pour construire les courbes qui m'étaient nécessaires; j'opérai de la même façon pour les mélanges d'aragonite et de vatérite, de vatérite et de calcite, ainsi que pour les mélanges ternaires aragonite-calcite-vatérite.

J'ai utilisé, pour l'aragonite et la calcite, les % suivants : 5, 10, 15, 30, 50, 70, 85, 90, 95 %. Pour les autres mélanges : 10, 30, 50, 70, 90 %. Pour les mélanges ternaires :

A = aragonite; C = calcite; V = vatérite.

$$\begin{array}{l} 1^\circ \quad A = 15 \\ \quad \quad C = 15 \\ \quad \quad V = 70 \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 2^\circ \quad A = 25 \\ \quad \quad C = 25 \\ \quad \quad V = 50 \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 3^\circ \quad A = 35 \\ \quad \quad C = 35 \\ \quad \quad V = 30 \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 4^\circ \quad A = 45 \\ \quad \quad C = 45 \\ \quad \quad V = 10 \end{array}$$

Les interférences retenues pour les comparaisons étaient celles qui donnent les intervalles : $d = 3,57 \text{ \AA}$ pour la vatérite et $3,40 \text{ \AA}$ pour l'aragonite, dans les mélanges comportant ces deux variétés. En effet, il existe un $d = 3,29 \text{ \AA}$ dans le spectre de l'aragonite, mais il est pratiquement confondu avec le $d = 3,30 \text{ \AA}$ de la vatérite. Dans les mélanges d'aragonite et de calcite, j'ai pris $d = 3,29 \text{ \AA}$ pour l'aragonite et $d = 3,04 \text{ \AA}$ pour la calcite. Dans ceux de vatérite et de calcite, $d = 3,30 \text{ \AA}$ pour la vatérite et $3,04 \text{ \AA}$ pour la calcite. Enfin, dans les mélanges ternaires, $d = 3,57 \text{ \AA}$ pour la vatérite, $3,04 \text{ \AA}$ pour la calcite et $3,40 \text{ \AA}$ pour l'aragonite.

Il faut, bien entendu, prendre quelques précautions opératoires. Ces précautions sont en rapport d'une part avec la recherche des conditions optima d'absorption du rayonnement par les produits utilisés, d'autre part avec les nécessités de l'enregistrement des interférences.

Les meilleurs clichés s'obtiennent pour des épaisseurs optima de matière traversée que le calcul permet de prévoir. Ces épaisseurs sont : pour l'aragonite : $4,4/100 \text{ mm}$; pour la calcite : $4,8/100 \text{ mm}$, et pour la vatérite : $5,2/100 \text{ mm}$. Pratiquement, on cherche à avoir $5/100 \text{ mm}$.

Il est préférable d'utiliser un papier photographique à grains fins et un révélateur au borax, enfin de développer tous les clichés en même temps. Je me suis toujours servi, pour les études quantitatives, de films émulsionnés sur une seule face, car l'image d'une raie est fréquemment dédoublée à l'enregistrement quand on opère sur film à 2 couches sensibles, et cela constitue une cause d'erreur.

Les interférences donnent à l'enregistrement des paraboles dont la surface ou la hauteur maximum peuvent être utilisées indifféremment pour apprécier l'intensité. Si l'on opère comme FAIVRE l'a fait, on porte en ordonnée, sur une courbe, un rapport d'intensités, le % des compositions se trouvant en abscisse. On obtient une hyperbole qui est asymptote à l'ordonnée. Mais, suivant que l'on considère $\frac{I_c}{I_a}$ ou $\frac{I_a}{I_c}$, les deux courbes tracées ne sont pas semblables. Elles se coupent au point d'ordonnée : $y = 1$. Si l'on pose : $\frac{I_c}{I_a} = X$, et $\frac{I_a}{I_c} = Y$, on a toujours $XY = 1$ (fig. 11), dans laquelle les intensités (I) sont représentées par la hauteur (H). Une partie de la courbe est toujours plus favorable que l'autre aux mesures : celle qui donne, pour une faible différence de composition du mélange, une grande différence d'ordonnée. Sur la courbe 1 de la figure 11, cette zone va de 0 à 30 % de calcite.

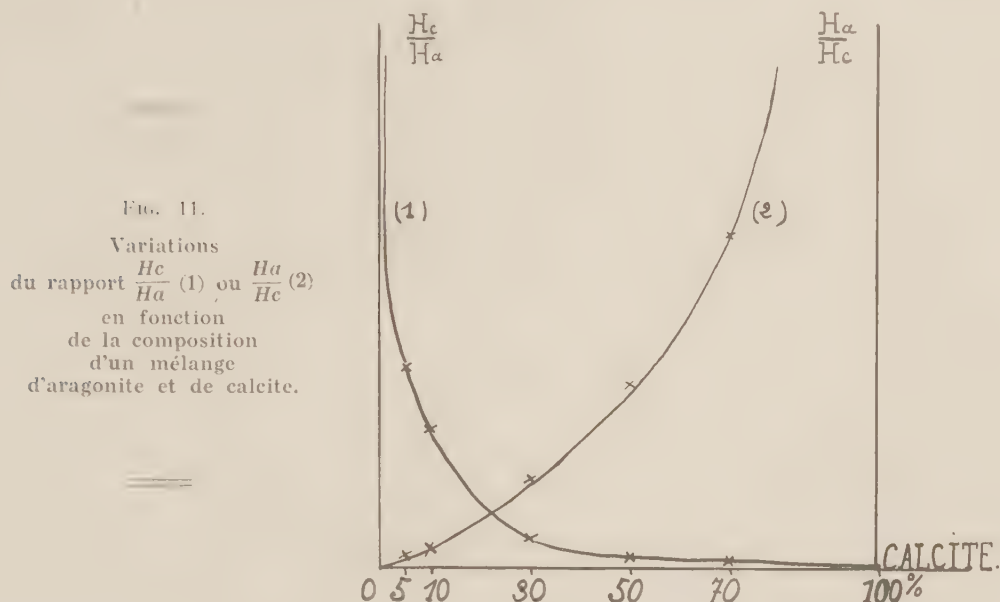
Il m'a semblé plus judicieux de placer en ordonnée les valeurs des pourcentages d'intensité, comme on place en abscisse les % de composition. Les courbes sont alors plus largement utilisables et l'on trouve deux points supplémentaires : ceux dont l'ordonnée et l'abscisse sont : 0 et 100.

Si H_a et H_c sont les hauteurs des raies enregistrées dans les clichés d'aragonite et de calcite, chaque point sera représenté en ordonnée par $\left(\frac{H_a \times 100}{H_a + H_c}\right)$. Si l'on évalue les intensités par les surfaces, on aura de même : $S_a \% = \frac{S_a \times 100}{S_a + S_c}$ (fig. 12). Les courbes des mélanges binaires ont toutes l'allure représentée sur la figure 13. Les diagonales sont alors des axes de symétrie et la relation qui relie les deux courbes s'exprime, si l'on pose :

$$\frac{H_v \times 100}{H_v + H_c} = X \quad \text{et} \quad \frac{H_c \times 100}{H_v + H_c} = Y.$$

par $X + Y = 100$.

Dans ces conditions, un mélange de vaterite et de calcite de composition déterminée, analysé à 3 reprises différentes, m'a donné les mêmes résultats à 2 % près. Dans une



autre circonstance, j'ai obtenu un résultat à 1 % près. Mais j'estime à 3 % la précision des mesures courantes.

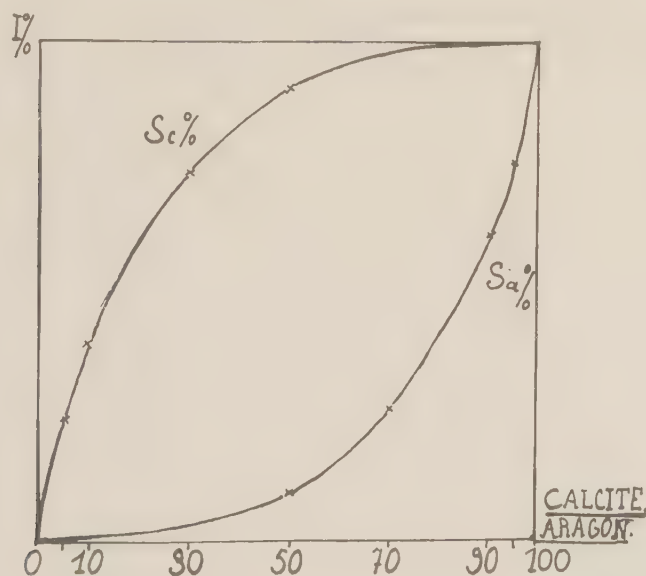


FIG. 12.

Variations
de S_a % et de S_c %
en fonction
de la composition
du mélange.
La zone d'utilisation
la plus favorable
va jusqu'à 50 %
de l'abscisse.

La même étude peut s'appliquer à des *mélanges ternaires*. J'ai confectionné des mélanges comportant 50 % de calcite par rapport à l'aragonite et des quantités croissantes de vaterite : 10, 30, 50 70 %. Si l'on trace des courbes suivant les principes précé-

demment exposés, en portant en ordonnée les % de l'intensité de la raie d'une variété par rapport à l'ensemble des intensités des 3 raies utilisées pour les comparaisons, et en

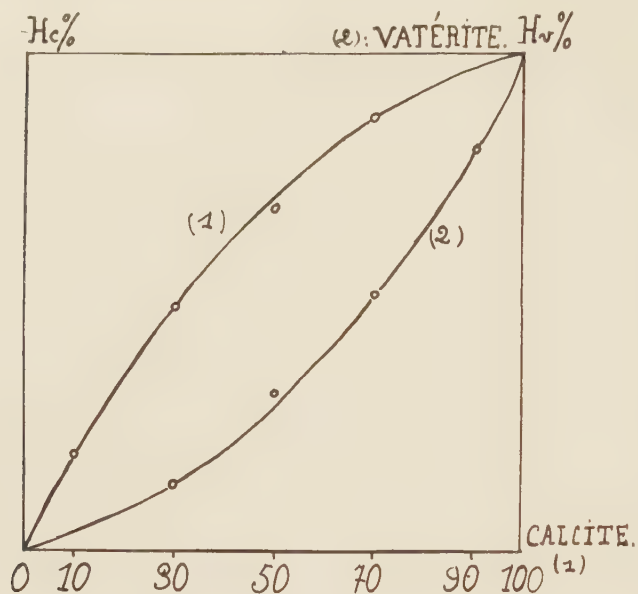


FIG. 13.

Variations
de Hc % et de Hv %
en fonction
du % de calcite
et de vaterite
dans un mélange
des deux variétés.

abscisse la composition des mélanges correspondants, on obtient les graphiques de la figure 14. On peut donc connaître la composition centésimale d'un mélange ternaire par

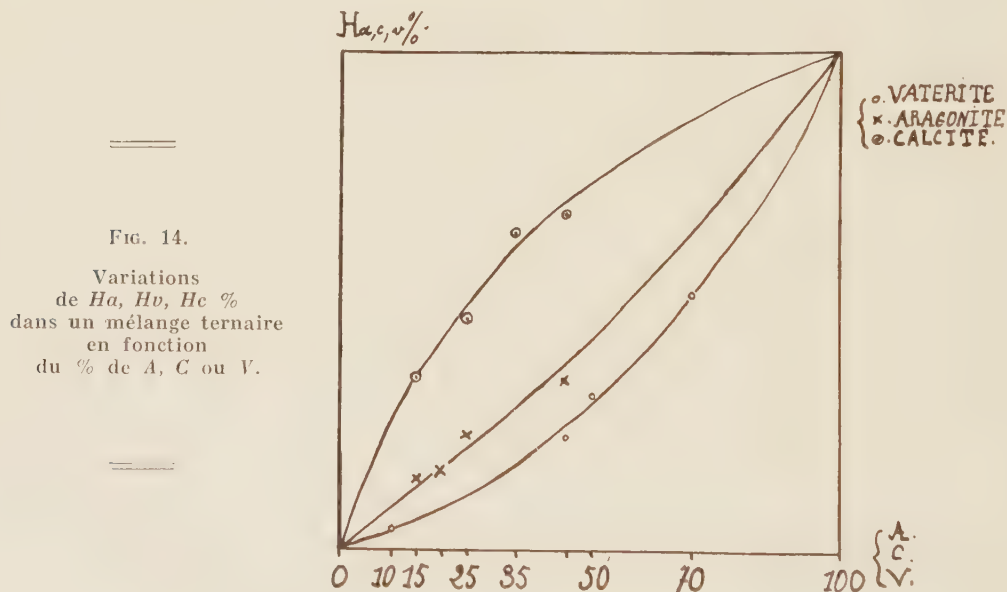


FIG. 14.

Variations
de Ha , Hv , Hc %
dans un mélange ternaire
en fonction
du % de A, C ou V.

la lecture simultanée de deux courbes sur trois; la 3^e valeur s'obtient par lecture sur la 3^e courbe évidemment, ou par un calcul très simple, en retirant du pourcentage 100 la somme des pourcentages des deux premières lectures [35].

La précision des mesures est inférieure dans ce cas à ce qu'elle est dans les mélanges binaires. Elle peut descendre à 4-5 %. Aussi peut-il être préférable d'évaluer la quantité présente de l'un des composants par rapport à un seul des deux autres, en utilisant les courbes des mélanges binaires correspondants, et de calculer ensuite la composition du mélange ternaire. En appliquant ce procédé aux 4 mélanges ternaires étudiés, j'ai retrouvé chaque fois les 50 % de l'aragonite par rapport à la calcite avec une précision de 1 à 3 %.

Il était possible désormais de reprendre l'étude des calcaires animaux et d'en déterminer avec précision la composition minéralogique. Mais, comme il ne s'agissait pas d'en dresser un catalogue, je me suis surtout procuré les coquilles des Mollusques qui m'avaient servi par ailleurs pour faire des études physiologiques.

B. — LES RÉSULTATS

Les résultats de ce travail sont rassemblés dans le tableau IV. La présence d'aragonite ou de calcite est indiquée par le signe + dans la colonne convenable, si la variété désignée existe à 100 % (indépendamment des traces possibles d'autres minéraux). S'il n'en est pas ainsi, le % du composé est représenté dans la même colonne. Si l'analyse quantitative n'a pu être faite dans les conditions que j'ai détaillées précédemment, les % sont appréciés à l'œil et marqués du signe : #.

Si l'on compare ce tableau aux analyses classiques, on remarque d'abord qu'il n'y a rien à ajouter aux déterminations qui ont été faites sur des coquilles entièrement calcitiques : *Ostreidæ*, *Pectinidæ*... On constate ensuite que l'aragonite est la forme minéralogique la plus répandue, mais qu'elle n'existe jamais pure : il y a toujours une trace de calcite. Il existe 3 catégories de Gastéropodes marins : ceux qui sont faits d'aragonite homogène, ceux dont la couche des prismes est en calcite et la couche de nacre en aragonite pure, enfin ceux dont la couche des prismes est en calcite pure et la couche de nacre en aragonite mêlée de calcite.

Le cas de la Patelle est spécial. Contrairement à ce que certains auteurs avaient affirmé, la coquille contient essentiellement de la calcite, sauf au sommet où la nacre contient aussi de l'aragonite. *L'Haliotis tuberculata* est entièrement fait d'aragonite et n'a pas par conséquent la couche des prismes en calcite qu'on lui avait attribuée.

Ces quelques analyses suppléent d'autre part à l'insuffisance des examens de MAYER sur les mêmes matériaux. Il est incontestable qu'il n'y a pas de vatérite dans les régénérats d'*Helix pomatia*, ni dans ceux d'*H. nemoralis* ou d'*H. aspersa*. Les idées préconçues de MAYER lui ont fait voir, sur des clichés sans doute assez peu clairs par ailleurs, de la vatérite où il n'y a en fait que de la calcite, qu'il n'a même pas signalée (1). Les régénérats d'*H. aspersa*, notamment, montrent à leur surface des rhomboédres, très petits certes, mais de forme parfaite. MOYNIER DE VILLEPOIX les avait déjà remarqués, LEVETZOW (*loc. cit.*) de même. Les sphérolithes se rencontrent plutôt sur les régénérats des *H. pomatia* et *nemoralis*. En tout cas, il m'est souvent arrivé d'obtenir des clichés de calcite presque

(1) Indépendamment des erreurs d'interprétation que les différences de valeur entre les d de la vatérite donnés par MAYER et FAIVRE permettaient de prévoir.

TABLEAU IV

Espèce	Zone de la coquille examinée	Composition minéralogique		
		Calcite	Aragonite	Divers
LAMELLIBRANCHES				
<i>Gryphea angulata</i> Lmk.	Couche des prismes. Nacre.	+		
<i>Chlamys varius</i> L.	Prismes. Nacre.	+		
<i>Anomya ephippium</i> L.	Prismes. Nacre.	+		
<i>Mytilus edulis</i> L.	Prismes. Bordure interne en dehors de l'insertion palléale. Nacre.	+ Trace.		
<i>Arca Noe</i> L.	Prismes. Nacre. Aire cardinale.	Trace. » »	+ + +	
<i>Pholas dactylus</i> L.	Prismes. Nacre.	Trace. »	+ +	
<i>Unio pictorum</i> L.	Prismes. Nacre. Sommet.	Trace. » »	+ + +	
<i>Sphaerium corneum</i> L.	Prismes. Nacre.	Trace. »	+ +	
<i>Tapes decussatus</i> L.	Prismes. Nacre, en deçà et au delà de l'insertion palléale.	Trace. »	+ +	
<i>Cardium edule</i> L.	Prismes. Nacre, de chaque côté de l'insertion palléale.	Trace. »	+ +	
<i>Venus verrucosa</i> L.	Prismes. Nacre.	Trace. »	+ +	
<i>Mya arenaria</i> L.	Prismes. Nacre, de chaque côté de l'insertion palléale.	Trace. »	+ +	
GASTÉROPODES MARINS				
<i>Patella vulgata</i> L.	Prismes. Nacre : a) bordure intérieure; b) zone profonde (au sommet).	+ + 75 % #		Trace de (PO ₄) ² Ca ₃ crist.
<i>Fissurella picta</i> (exotique).	Prismes. Nacre : bourrelet apical, zone de la bordure ou zone intérieure à l'insertion palléale.	+ Trace.		
<i>Littorina obtusata</i> L.	Prismes. Nacre.	+ 50 % #		
			50 % #	

TABLEAU IV (suite).

Espèce	Zone de la coquille examinée	Composition minéralogique		
		Calcite	Aragonite	Divers
<i>Littorina littorea</i> L.	Prismes. Nacre.	+ 30 % #	70 % #	
<i>Purpura lapillus</i> L.	Prismes. Nacre.	+ Forte trace.	+	
<i>Haliotis tuberculata</i> L.	Prismes. Nacre.	Trace. Trace.	+ +	
<i>Calliostoma zizyphinum</i> L.	Prismes. Nacre.	Trace. »	+ +	
<i>Capulus hungaricus</i> (Montf.).	Prismes. Nacre.	Forte trace. Trace.	+ +	
<i>Trochocochlea crassa</i> (Pult.).	Prismes. Nacre.	Trace. »	+ +	
<i>Vermetus triqueter</i> (Bivona).	Prismes. Nacre.	Trace. »	+ +	
GASTÉROPODES TERRESTRES				
<i>Helix pomatia</i> L.	Dermophragme (été). Prismes (sommet du dernier tour). Nacre. Apex. Régénérats de : 18 heures; 54 heures; 1 mois, 4 jours.	+ Trace. Trace. Trace. 24 % 58 % 50 %	+ + + + 76 % 42 % 50 %	
<i>Helix aspersa</i> Müll.	Prismes. Nacre. Apex. Régénérats de : 45 heures; 49 heures.	Trace. » 5 % 63 % 60 %	+ + 95 % 37 % 40 %	
<i>Helix nemoralis</i> L.	Prismes. Nacre. Apex. Régénérats de 9 jours.	Trace. » +	+ + + Trace.	Peut-être du calcaire amorphe
Jeunes <i>H. nem.</i>			Trace.	Calcaire amorphe

pure sur des régénérats d'*Helix aspersa* de 48 heures. Il s'y trouvait seulement des quantités variables d'aragonite : de 3 à 7 % selon les individus, et ces déterminations sont à ajouter à celles qui figurent dans le tableau. L'apex des coquilles d'*H. aspersa*, qui correspond à la coquille jeune, est plus riche en calcite que les tours de spire. Sa teneur en cette variété y devient assez forte pour qu'on puisse la doser. Chez *H. nemoralis*, par

contre, il n'y a pas de calcite dans l'apex; malgré 8 heures de pose aux rayons X dans de bonnes conditions, je n'ai pu repérer que des raies faibles d'aragonite. J'ai repris la même étude sur les coquilles de jeunes *H. nemoralis* âgés de moins de deux mois, et je n'ai observé, dans les mêmes conditions, qu'une très faible trace d'aragonite. Il est vraisemblable que le calcaire qui se forme ici est d'abord du calcaire amorphe (1); l'aragonite apparaîtrait plus tard. MAYER y avait trouvé de la vatérite.

Je considérerai donc comme certain que le problème du déterminisme des formes minéralogiques du calcaire se ramenait uniquement, chez les Mollusques, à expliquer le balancement de l'aragonite et de la calcite. Mais il était troublant de constater qu'à deux reprises, à l'occasion de vérifications sur des matériaux où l'on avait cru voir de la vatérite, il avait fallu rectifier (concrétions calcaires du parenchyme des Cestodes, coquilles de Mollusques); et c'est pourquoi je pense qu'il sera nécessaire de reviser toutes les déterminations de vatérite chez les animaux avant de poser le problème de l'existence, *in vivo*, de cette forme minéralogique particulièrement instable. Je signalerai encore à ce propos, que F. K. MAYER affirme que les spicules de *Doris tuberculata* contiennent un mélange de vatérite et d'aragonite, alors que PRENANT déclare y avoir vu de la vatérite seulement. Mais comme les résultats qui viennent d'être exposés le prouvent suffisamment, il y a lieu de se méfier des déclarations de MAYER et, pour ma part, je laisserai un point d'interrogation sur les spicules de *Doris tuberculata*. Toutes ces considérations situaient avec précision le problème posé. Il restait à lui trouver une solution. Mais avant d'aborder la partie physiologique de ce travail, dont on pouvait espérer une première explication, il fallait s'assurer qu'aucun facteur important n'avait été négligé. En particulier, il était nécessaire de préciser l'influence du pH et des traces de certains métaux, dont l'étude n'avait pas été concluante.

II. — Peut-on attribuer à des facteurs chimiques ou physico-chimiques le déterminisme des formes minéralogiques du calcaire ?

A. — ROLE DU pH

Les travaux de MARCEL PRENANT (*loc. cit.*) avaient suffisamment démontré que le pH des milieux précipitants peut jouer un rôle dans la stabilisation, sinon dans la formation de certaines variétés de calcaire : la vatérite, en particulier, ne peut se former qu'à des pH supérieurs à 9; mais l'obtention de vatérite cristallisée par LUCAS dans d'autres conditions nous oblige à revenir sur cette notion. Bien que PRENANT n'ait jamais exprimé par écrit cette opinion, il avait pensé que le pH pouvait être la cause de la différenciation du calcaire en aragonite et en calcite. Il aurait donc fallu admettre qu'il y a une limite très nette entre les zones de pH dans lesquelles la calcite d'une part, l'aragonite de l'autre, précipitent ? On ne connaît rien d'équivalent *in vitro*. En supposant même que cela soit possible, comment pourrait-on expliquer la présence simultanée d'aragonite et de

(1) Il serait intéressant de rechercher s'il est stabilisé par du phosphate tricalcique, lui-même amorphe, ou s'il ne l'est pas. Je ne l'ai pas fait parce que cela n'aurait rien changé à l'ensemble du problème, mais je rappellerai à ce sujet que W. BIEDERMANN (*Zeitsch. f. allg. Physiol.*, Bd. 1, 1902), cité par LEVETZOW [196] a montré que les jeunes coquilles d'*Helix* sont riches en phosphate tricalcique.

calcite dans la nacre de *Littorina littorea* ? En imaginant que les deux zones, la zone calcitique et la zone aragonitique, sont séparées par une zone mixte ? cela encore est bien arbitraire. Malgré tout, et parce qu'il pouvait être utile de connaître le pH des liquides au sein desquels le calcaire se dépose, je me suis préoccupé de mesurer ce pH.

Je préciserai d'abord que la solution colloïdale qui donne naissance à la coquille ne peut être étudiée, puisqu'elle n'est sécrétée qu'aux périodes de croissance et qu'au surplus il en existe fort peu. Son pH nous est donc inconnu. Mais cette solution se mêle au liquide extrapalléal; celui-ci, nous l'avons vu, est analogue au sang du Mollusque; il joue le rôle de liquide « tampon », de sorte qu'en mesurant le pH du liquide extrapalléal, on apprécie en fait le pH efficace du mélange.

Le liquide extrapalléal, chez la plupart des Mollusques, forme une mince pellicule qui recouvre la surface du manteau; aussi est-il délicat d'utiliser une méthode électrométrique pour la mesure de son pH. En effet, l'électrode de verre la plus courante est une bulle de verre Corning de 1 cm de diamètre environ, que l'on plonge, pour faire une mesure, dans quelques cm³ du liquide à examiner. Mais j'ai pu disposer d'un nouveau modèle d'électrode, susceptible de fonctionner sur le pH-mètre Jouan. L'extrémité, effilée, forme un cylindre de 3 mm de diamètre; elle est fermée par une membrane de verre Corning, plane et aussi mince que possible. L'expérience prouve que cette électrode, humectée, peut fonctionner normalement. Elle est seulement un peu moins sensible que l'électrode sphérique. Elle permet d'effectuer des mesures à 2/10 d'unité pH près.

Je l'ai d'abord expérimentée sur l'homme, en mouillant légèrement la peau avec de l'eau distillée. On trouve : sur le poignet : pH, 6; au creux du bras, 5,05; au front, 5,35; sur la paume de la main, 5,90; sur le dos de la main, 5,80 et 5,90.

Ces résultats sont en accord avec les mesures antérieures réalisées par des méthodes colorimétriques (1).

SUR LES LIQUIDES EXTRAPALLÉAUX DE MOLLUSQUES : *Anodonta cygnea* L. Exemple de 8 cm de long sur 5 cm de large : pH = 8,30 (8,25 sur un autre exemplaire, avec l'électrode de verre classique). — *Unio pictorum* L. Liquide extrapalléal : pH, 8,25; sous le manteau, 8,10; branchie, 8,15; pied, 7,80. — *Helix pomatia* L. Surface du poumon, 3/4 d'heure après effraction de la coquille : pH, 7,5. — *Paludina vivipara* Lmk. Liquide extrapalléal : pH, 7,9. — *Planorbis corneus* L. Liquide extrapalléal : pH : 1° 8,35; 2° 7,8 à 8. — *Sphaerium corneum* L. Liquide extrapalléal : pH, 8; pied, 6,75. — *Arion rufus* L. Peau (mucus émis par la peau) : pH = 7; Sole pédieuse, 7; hémolymph, 7,7. — *Lymnea stagnalis* L. Liquide extrapalléal : pH = 7,7 à 7,8. — *Gryphea angulata* Lmk. Selon KOKUBO (in ROBERTSON, loc. cit.) le pH du sang de l'Huître est de 7,45 quand il est frais et passe à 7,00 après 2 jours quand on l'abandonne à l'air. Sur des Huîtres fraîches, j'ai trouvé pour le liquide qui humecte le manteau un pH de : 6,70, mais j'ignore depuis combien de temps ces Huîtres étaient sorties de l'eau. De toutes façons, il est évident, au moins en première approximation, que la surface supérieure du manteau (2) est au contact de l'eau de mer dont le pH, voisin de 8 en général, doit avoir une influence prépondérante sur le liquide extrapalléal. Chez *Mytilus edulis* L., j'ai trouvé, pour le liquide extrapalléal, un pH de 7,5. L'animal était sorti de l'eau depuis 48 heures.

(1) PARAT (MAURICE) : Le pH interne de la cellule animale : in *Etudes sur la chimie physiologique de la peau*, par MM. DEJUST, VERNE... A. Legrand, édit., 1928.

(2) Il n'y a pas d'insertion palléale.

Peut-on tirer de ces résultats une indication susceptible d'expliquer la formation de l'aragonite ? Il ne semble pas qu'on puisse le faire. Le pH du liquide extrapalléal de *Gryphea angulata* dont la coquille est entièrement calcitique est de 6,70 ; mais on peut penser que ce liquide, quand l'animal n'est pas sorti de l'eau, a un pH équivalent à celui du sang dont la valeur est de 7,45. Or, le pH du liquide extrapalléal d'*Helix pomatia*, qui donne dans les conditions où je me suis placé pour faire cette mesure un mélange d'aragonite et de calcite, est de 7,5 ? Remarquons simplement que le liquide extrapalléal des Mollusques que j'ai examinés est alcalin, de pH voisin de 8. LERICHE et POLICARD (*loc. cit.*) avaient d'ailleurs écrit, en 1925, que le rôle du pH dans les phénomènes de calcification « était sans doute moins important qu'on ne pourrait le croire à première vue, étant donné l'existence de mécanismes régulateurs et les faibles variations possibles du pH. Chez les Mollusques, le dépôt calcaire se produit seulement dans des figurations hyalines à réaction alcaline. Il y a un rapport certain entre la réaction alcaline de la matrice et le dépôt du calcaire ». Je rappellerai, à propos de cette dernière phrase, l'indispensable intervention de la phosphatase alcaline dans la formation des dépôts calcaires chez les Mollusques.

B. — ROLE DES TRACES DE CERTAINS MÉTAUX

Les métaux susceptibles de favoriser la formation de l'aragonite sont en nombre limité. Seuls, ceux dont les carbonates cristallisent dans le système orthorhombique peuvent être pris en considération. PRENANT avait surtout songé à l'influence du carbonate de strontium, les carbonates de Ba et de Pb, isomorphes également de l'aragonite, n'étant pas très répandus dans la matière vivante. On ne disposait pas alors d'un procédé de dosage du Sr en présence de calcium. Mais, à l'heure actuelle, il est facile de résoudre le problème, surtout si l'on utilise l'analyse spectrographique, qui permet de détecter des traces infimes de n'importe quel élément.

Pour valider ou infirmer l'hypothèse de l'intervention des carbonates isomorphes, il suffisait de comparer les compositions de coquilles entièrement calcitiques et entièrement aragonitiques. J'ai examiné : 1° un fragment de coquille d'*Helix aspersa*, un fragment de coquille de *Gryphea angulata*, un régénérat d'*Helix aspersa* de 2 mois (contenant donc surtout de l'aragonite); 2° un fragment de coquille d'*Anodonte* et un de *Pecten*. Les résultats de cet examen, pratiqué sur 1 cg de matière, sont les suivants :

1° Sr. Observé dans tous les échantillons; non seulement les raies qui se trouvent à 4 500 Å, mais aussi celles qui apparaissent vers 3 400-3 500 Å. L'intensité relative de ces raies, par rapport à celles du Ca, est la même pour tous les fragments.

Le Zn, le Ba, le Pb, le Mn, sont absents partout. On repère partout : du Ca bien entendu, pas mal de Mg, de la silice et des traces d'aluminium. Les raies de la silice sont nettement plus intenses cependant dans le régénérat (2 639 et 2 450 Å).

2° Sr. Présent dans les deux coquilles, mais à l'état de traces très faibles, dans l'une comme dans l'autre. Le Ba et le Zn sont absents. Il y a des traces d'Al dans les deux. Mg et Si sont présents dans les deux échantillons, mais en quantité négligeable chez l'*Anodonte*. Le Mn existe en quantité plus élevée chez l'*Anodonte* que chez le *Pecten*.

Puisque le Sr existe à l'état de trace, aussi bien dans les coquilles calcitiques qu'aragonitiques, il est clair que la formation de l'aragonite ne peut être attribuée au carbonate de stron-

tium. Encore faudrait-il, s'il n'y en avait que dans les coquilles aragonitiques, que la quantité présente en fût beaucoup plus considérable qu'elle ne l'est pour être déterminante. A ce propos, je signalerai que le spectrographe utilisé permet de reconnaître le 1/100.000 de mg...

Ainsi, aucune des tentatives qui ont été faites pour expliquer la formation de l'aragonite sur des bases chimiques ou physico-chimiques n'a abouti à un résultat. Il ne restait vraiment plus à envisager qu'une intervention biologique. Dans ce domaine, on pouvait étudier les protéines ou les diastases. Mais, comme nous l'avons vu, les données du problème semblent conduire à l'idée d'une intervention diastasique, plus précisément à celle de l'anhydrase-carbonique. Il restait possible, en cas d'échec dans une recherche de cet ordre, de revenir aux protéines.

DEUXIÈME PARTIE

L'INTERVENTION DE L'ANHYDRASE-CARBONIQUE DANS LES PHÉNOMÈNES QUI ABOUTISSENT A LA FORMATION DES COQUILLES EST LA CAUSE ESSENTIELLE DU DÉTERMINISME DES FORMES MINÉRALOGIQUES DU CALCAIRE CHEZ LES MOLLUSQUES

CHAPITRE PREMIER. — L'ANHYDRASE-CARBONIQUE

I. — Historique.

Bien que la découverte de l'anhydrase-carbonique soit relativement récente, il existe déjà une littérature considérable sur cette question. J'ai volontairement limité l'historique aux parties qui présentent un intérêt directement en rapport avec les problèmes traités. Mais la bibliographie que l'on peut trouver à la fin de cet ouvrage est plus complète.

A. — DÉCOUVERTE ET PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES

HENRIQUÈS, étudiant en 1928 les conditions de passage du CO_2 sanguin dans l'air alvéolaire, postula, pour expliquer ses observations, l'existence d'une diastase susceptible d'agir sur l'équilibre : $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$. En 1931, MELDRUM et ROUGHTON découvrirent cette diastase et lui donnèrent le nom d'*anhydrase-carbonique*.

Bien qu'elle soit localisée dans les globules rouges, elle est nettement distincte de l'hémoglobine (BRINKMAN, MARGARIA, MELDRUM et ROUGHTON [56]). D'ailleurs, MELDRUM et ROUGHTON ont préparé l'enzyme, à partir des globules rouges, sous forme d'un liquide jaunâtre, extrêmement actif, totalement différent de l'hémoglobine. KEILIN et MANN [99],

LEINER et LEINER [115], SCOTT et MENDIVE [148] indiquèrent diverses techniques de préparation. SCOTT et FISHER [147] réussirent à obtenir la diastase cristallisée. L'anhydrase est une métalloprotéine dont le groupement prosthétique est constitué par du *zinc*. KEILIN et MANN en estiment la teneur à 0,31-0,34 %. Quant au poids moléculaire, MELDRUM et ROUGHTON l'avaient évalué à 30 000 environ et ce chiffre fut confirmé par la suite. KIESE et HASTINGS [106] se sont surtout spécialisés dans l'étude de la cinétique de l'anhydrase. Ils ont montré d'autre part que le point isoélectrique de l'enzyme est à $\text{pH} = 5,6$ et que l'optimum de fonctionnement est à $\text{pH} = 8,10$ [103]. Parmi les nombreux travaux qui ont été consacrés à l'anhydrase depuis sa découverte, on peut distinguer deux préoccupations essentielles : d'une part on a cherché à connaître les conditions de son fonctionnement, d'autre part à la localiser avec précision.

a) LES CONDITIONS D'ACTION DE LA DIASTASE. — Elles dépendent au plus haut point de la composition du milieu dans lequel l'enzyme évolue; aussi est-il indispensable d'en dénombrer les activateurs et les inhibiteurs.

VAN GOOR [91], qui en a fourni une revue complète, en 1948, distingue, parmi les inhibiteurs, dont l'action peut être totale ou partielle, les inhibiteurs spécifiques et ceux qui ne le sont pas. Ces derniers ont une action généralement défavorable sur d'autres enzymes. Ce sont : les cyanures, l'oxyde de carbone, les sulfites, le nitrure de sodium, enfin certains sels métalliques; MELDRUM et ROUGHTON (*in* VAN GOOR) ont examiné ceux de 23 métaux différents. Le Cu, l'Ag, l'Au, le Zn, le Hg, le Va donnent des résultats positifs à des concentrations variées. ROUGHTON et BOOTH [142] ont montré également que certains sels neutres pouvaient diminuer l'activité des solutions d'enzyme, et notamment NH_4Cl , KCl, NaCl, KBr, KI, NO_3Na , SO_4K_2 , l'acétate de sodium et le cacodylate de sodium. Les cations Na^+ , K^+ et NH_4^+ , seraient responsables du phénomène. Quant aux anions, ils se rangent, dans l'ordre des pouvoirs inhibiteurs croissants, de la manière suivante : $\text{SO}_4^{4-} < \text{acétate}^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^-, \text{NO}_3^-, \text{I}^-$.

KIESE et HASTINGS [103] ont montré que les oxydants sont aussi des inhibiteurs, par exemple : le permanganate, les iodates, les periodates, les perchlorates, les chlorates, les persulfates et les bromates. Cette inhibition est réversible sous l'action de certains réducteurs comme l'acide ascorbique, la cystéine, l'hydroquinone, quand le contact entre l'enzyme et l'oxydant n'a pas dépassé 10 minutes. HAUGAARD (*in* VAN GOOR) signale que l'anhydrase n'est pas inhibée par l'oxygène à la pression de 7 atmosphères, contrairement à d'autres enzymes.

Parmi les inhibiteurs spécifiques, on trouve d'abord les sulfamides, dont certains sont plus puissants et plus étroitement spécifiques que les autres.

VAN GOOR estime que l'effet inhibiteur dépend du degré de purification de l'enzyme et apparaît d'autant plus nettement que la diastase est plus pure. D'autre part, il y aurait, avec le temps, une légère régénération de l'activité diastasique. Enfin, selon VAN GOOR, le % d'inhibition serait d'autant plus élevé que la concentration est plus faible. Mais les chiffres cités par l'auteur à l'appui de cette affirmation ne sont pas convaincants; il y a peut-être là une erreur d'interprétation. Le sulfocyanure de potassium (HOVE, ELVEHJEM et HART [96]) figure encore parmi les inhibiteurs spécifiques, ainsi qu'un inhibiteur naturel, présent dans le sérum, que BOOTH [53] découvrit. Cet inhibiteur n'est pas dialysable; sa nature exacte est inconnue, mais ce composé est étroitement associé aux protéines du sérum dont il suit toutes les transformations au cours des traitements

qu'on peut leur faire subir. On ne l'a pas trouvé dans le sang de certains animaux, mais s'il faut en croire VAN GOOR, ce résultat s'expliquerait par la présence simultanée d'activateurs de la diastase.

Les activateurs ont d'abord été signalés par LEINER [116] dans le plasma humain. LEINER et LEINER [115] en distinguent deux groupes : l'un, qui favorise l'hydratation du CO_2 par l'enzyme; il est représenté par la cystéine, le glutathion, l'histamine, l'histidine; l'autre, qui est représenté par des substances qui activent la déshydratation. On les trouve dans le sang des Mammifères, sauf, peut-être, les activateurs du deuxième groupe dont l'existence est contestée.

Il existe enfin des stabilisateurs de l'enzyme qui permettent de conserver les solutions diastasiques sans qu'elles perdent leur activité. Les peptones, et quelques autres solutions comme celles de gélatiné, d'édestine, d'albumine d'œuf, de caséine... ont cette propriété (SCOTT et MENDIVE [148]). Plusieurs acides aminés et des dérivés puriques seraient des activateurs. Selon LEINER et LEINER (*loc. cit.*), il en serait de même pour les extraits de certains tissus. Mais VAN GOOR ne l'admet pas.

b) LA RÉPARTITION DE L'ANHYDRASE-CARBONIQUE. — L'anhydrase-carbonique se trouve toujours dans les globules rouges des Vertébrés, mais pas dans le plasma. Si l'on ajoute de l'enzyme au plasma, il est rapidement éliminé. La restauration de l'enzyme après une hémorragie s'effectue en 5 jours environ (VAN GOOR : Carbonic anhydrase after hemorrhage. *Act. brev. neerl.*, 13, 21, 1943). Il n'y a pas d'enzyme dans les leucocytes. On a cherché aussi l'anhydrase dans le milieu intérieur et dans le liquide coelomique des Invertébrés. On ne l'a pas trouvé dans le sang des Mollusques, des Insectes (sauf la larve de *Chironomus*), des Crustacés, de sorte qu'il est inutile de laver par perfusion les organes de ces animaux quand on y recherche l'anhydrase. Chez les Annélides : l'*Arenicola* et *Nereis* ont un sang riche en diastase, mais il n'en est pas ainsi chez *Lumbricus* et *Ophelia* (bien qu'il y ait de l'hémoglobine de part et d'autre).

La diastase existe dans les tissus. Sa teneur est particulièrement forte dans les organes où il y a de l'acide carbonique, et notamment dans le pancréas, la muqueuse gastrique, le rein, les glandes salivaires, les organes coquilliers. La signification de sa présence dans la rétine et le système nerveux central est moins claire. L'enzyme se retrouve encore dans les organes où il joue un rôle dans la respiration et les sécrétions acides : par exemple dans les cellules acidophiles des branchies et la glande à gaz de la vessie natatoire des Poissons, la pseudo-branchie des Sélaciens (LEINER et LEINER, *loc. cit.*), l'intestin.

Chez les Invertébrés, il y a fréquemment de l'anhydrase. Il y en a dans les tissus de l'Anémone de mer qu'on a même utilisée pour l'extraction de l'enzyme : MELDRUM et ROUGHTON (1933), VAN GOOR (1937 et 1940, *loc. cit.*); BRINKMAN (*loc. cit.*) a trouvé de la diastase dans les tissus de certaines Annélides : *Harmothoë*, *Nephtys*. VAN GOOR en a repéré chez des Echinodermes : *Asterias glacialis*, *Holothuria*, mais seulement dans les glandes intestinales et les organes génitaux; FERGUSON, LEWIS et SMITH ont signalé de l'anhydrase dans les branchies de Limule, du Homard et de Libinia. Les Crustacés et les Mollusques, bien que leur sang soit dépourvu de diastase, en ont dans divers organes : l'hépto-pancréas, les muscles, les organes génitaux; dans les branchies, notamment chez *Loligo*. FLORKIN et de MARCHIN [79] ont étudié la répartition de l'enzyme chez l'Anodonte. MAETZ [124] a étendu cette liste à quelques Invertébrés. Les Tuniciers sont complètement

dépourvus de diastase. VAN GOOR, enfin, a étudié l'influence de l'anhydrase sur les tissus, *in vitro*.

On a trouvé de l'anhydrase chez quelques plantes, mais il semble bien que les extraits végétaux n'aient pas les mêmes propriétés que les préparations d'origine animale (BRADFIELD, *J. R. G. Nature*, 159, 467, 1947).

B. — ANHYDRASE-CARBONIQUE ET CALCIFICATION

Dès leur premier mémoire, MELDRUM et ROUGHTON (*loc. cit.*) avaient étudié l'influence, *in vitro*, de l'anhydrase sur différentes réactions au cours desquelles le carbonate de calcium apparaît. Ils avaient noté que la diastase peut accélérer la décomposition du CO_3Ca par un acide faible, aussi bien qu'elle peut favoriser le dépôt du CO_3Ca , quand on l'ajoute à un mélange en équilibre de carbamate, de carbonate et de bicarbonate d'ammonium que l'on agite avec une suspension de SO_4Ca . Ce dernier sel est décomposé et donne aussitôt : $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et CO_3Ca qui précipite. Il se forme aussi du carbamate de calcium assez soluble qui ne se décompose que lentement, lorsque l'on élimine CO_3Ca du milieu. Il n'est pas sans intérêt de remarquer que M. et R. avaient déjà eu l'occasion de montrer qu'il existe des protéines-carbamates dans les liquides physiologiques, particulièrement à basse température. Et c'est pourquoi les mêmes auteurs avaient déclaré que « l'étude des vitesses de dissolution et de déposition du carbonate de calcium présente une certaine importance biologique, en ce qui concerne la formation des coquilles et autres dépôts calcaires ». Cette opinion fut confirmée par les travaux qui suivirent. D'abord, COMMON a mis en évidence la présence de l'enzyme dans l'oviducte de la Poule. BENESCH, BARROW et MAWSON [49] ont ensuite réussi à inhiber la formation des coquilles d'œuf en injectant aux animaux certains sulfamides. GUTOWSKA et MITCHELL [93] ont observé une corrélation directe entre l'activité de l'anhydrase dans la glande coquillière d'une part, la production du calcaire de la coquille d'autre part. L'opinion généralement admise depuis lors est qu'il se fait localement, dans l'oviducte, une accumulation, à haute concentration, d'ions bicarbonate qui proviennent de l'ionisation de l'acide carbonique, et dont le pourcentage dépend de la présence en quantité suffisante d'anhydrase-carbonique. La décomposition de ce bicarbonate de calcium donnerait naissance à la coquille. D'autre part, BENESCH, CHANCE et GLYNN [50] ont traité des Rates en gestation par les sulfamides inhibiteurs de la calcification et constaté que les membres des embryons présentaient des lésions et avaient subi une incontestable décalcification. L'examen aux rayons X et l'étude histochimique le révèlent facilement. A vrai dire, il est possible que les inhibiteurs agissent dans ce cas sur la phosphatase alcaline autant que sur l'anhydrase.

En tous cas, il est vraisemblable que l'anhydrase-carbonique a dans la nature des rôles multiples. C'est ce que NUMANOI [135] avait répété. Mais on ne connaît avec certitude que deux de ces rôles : le rôle respiratoire et, de manière moins précise, le rôle dans la formation des dépôts calcaires. Il était donc normal de penser à l'intervention de l'anhydrase dans la formation des coquilles de Mollusques. Il restait à reprendre avec précision l'étude de la répartition de l'anhydrase dans les tissus palléaux qui sécrètent les produits coquilliers. Les principaux documents que l'on pouvait trouver à ce sujet étaient ceux que FREEMAN et WILBUR [81] avaient récemment fourni : ces auteurs avaient trouvé

de l'anhydrase dans le manteau de 12 espèces de Pélécypodes et 8 de Gastropodes, sauf chez *Atrina rigida* (dont la coquille a une couche de prismes en calcite) et *Crepidula fornicata*; ces résultats les avaient amenés à écrire que la coquille peut se former en l'absence de diastase et que, d'autre part, la présence de l'enzyme dans le manteau ne peut être prise comme preuve que la formation de la coquille dépend de son activité.

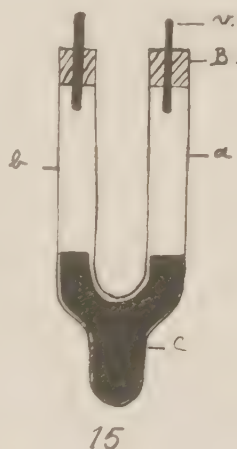
c. — LES MÉTHODES D'ÉTUDE ET LES UNITÉS UTILISÉES

J'ai gardé pour la fin cette partie importante de l'histoire de l'anhydrase-carbonique, parce que j'ai eu l'occasion de mettre au point une nouvelle technique; qu'il importe de comparer à celles qui existaient déjà.

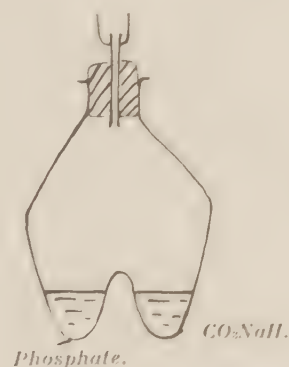
Le principe généralement utilisé dans les méthodes qui vont être décrites est le suivant : on mélange deux solutions dont l'une est susceptible de donner naissance à du CO_2H_2 . On recueille le CO_2 qui se dégage, en présence et en l'absence de diastase et on compare les résultats obtenus dans des conditions standard. Certains procédés utilisent, pour évaluer l'activité diastasique, la mesure de la vitesse du changement de pH, que l'on suit à l'aide d'un indicateur coloré, d'autres une technique manométrique.

FIG. 15. — Tube en Y de Brinkman : Schéma.
— a, 1 cm³ 0,005 M CO_2 ; b, 1 cm³ 0,02 M. CO_3NaH + rouge de phénol; c, 2 cm³ Hg; v., baguette de verre; B., bouchon.

FIG. 16. — Batelet de Meldrum et Roughton (coupe).



15



16

Parmi les premiers, il faut d'abord citer la méthode de BRINKMAN : l'appareil utilisé par cet auteur est celui que représente la figure 15. On mélange une solution de CO_2 à une solution de bicarbonate de sodium en présence de rouge de phénol. La solution de CO_2 est préparée en ajustant à 100 cm³ : 5 cm³ HCl 0,1 M + 5 cm³ CO_3NaH 0,1 M. Les dilutions sont choisies de telle manière que la réaction témoin dure 2 minutes. Quand l'acidité du milieu change, le rouge de phénol vire du rouge au jaune (pH : 8,4 à 6,8). Le mélange s'effectue en retournant le tube en Y de BRINKMAN au moment choisi. Il y a, bien entendu, quelques précautions à prendre, tant dans la confection des solutions que dans l'expérience proprement dite. Celle-ci doit notamment s'effectuer à température constante. Le temps de virage est moindre en présence de diastase. VAN GOOR (1937), qui utilisa la méthode de BRINKMAN, propose, comme unité : la quantité d'enzyme qui accélère deux fois la réaction à 0°, c'est-à-dire : $\frac{t^0 - t}{t} = 1$, si t est le temps de virage en présence de diastase et t⁰ en l'absence de diastase, dans les conditions indiquées : 0,05 cm³ du liquide à examiner ajoutés à 1 cm³ de la solution 0,005 M- CO_2 , et à 1 cm³ 0,02 M- CO_3NaH .

Cette méthode a été utilisée par différents auteurs avec quelques variantes : notamment par PHILPOT et PHILPOT [137], et par ROUGHTON et BOOTH [142], qui emploient un indicateur coloré en présence de véronal. WILBUR et ANDERSON (*J. Biol. Chem.*, 176; 147, 1948) ont proposé une méthode électrométrique pour remédier au principal inconvénient de la méthode colorimétrique : l'inhibition, à des taux variables, de l'anhydrase carbonique par le rouge de phénol et le bleu de bromothymol (KIESE et HASTINGS (*loc. cit.*) avaient signalé ce phénomène). Mais A. M. CLARK [61] n'a pas apprécié la méthode électrométrique non plus. À l'heure actuelle, les méthodes colorimétrique et électrométrique sont pratiquement abandonnées.

Les méthodes manométriques les plus employées se sont inspirées du procédé indiqué dès le début par MELDRUM et ROUGHTON. Ce procédé est connu sous le nom de « *Boat-method* ». Les liquides mélangés sont : d'une part 2 cm³ d'une solution de phosphate obtenue en mélangeant à volumes égaux du PO₄H Na₂ $\frac{M}{5}$ et du PO₄H₂K $\frac{M}{5}$, d'autre part 2 cm³ d'une solution de CO₃NaH $\frac{M}{5}$ dissous dans de la soude $\frac{M}{50}$. Chaque liquide est placé dans un compartiment du « bateau », c'est-à-dire du batelet en verre divisé en deux par une cloison médiane. Le flacon est relié à un manomètre de Barcroft. On agite violemment dans un bain-marie à 15°, les liquides se mélangent et l'on étudie le dégagement du CO₂ (fig. 16). Les variations de pH sont évidemment limitées dans la boat-method par l'existence du tampon au phosphate, et de plus elles sont constantes. On repère les indications du manomètre : 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 secondes après le début de l'expérience, et, si cela est nécessaire, à des intervalles d'une minute. M. et R. proposent, comme unité : la quantité d'enzyme qui, dissoute dans 4 cm³ du mélange phosphate-bicarbonate donne au rapport $\frac{R - R_0}{R_0}$ la valeur 1 à 15°; autrement dit, l'unité-enzyme est équivalente à la quantité d'enzyme nécessaire pour doubler le % du « rendement » en CO₂ dans des conditions comparables (R. et R₀ étant le % de la réaction, par rapport au volume total de CO₂ susceptible d'être dégagé par la réaction, en présence et en l'absence de catalyseur). Soit E cette unité, e celle de BRINKMAN. On estime actuellement, d'après les mesures, que $E = 5 e$ (in VAN GOOR, *loc. cit.*). Dans l'une ou l'autre méthode, l'activité est exprimée par le nombre d'unités par mg de poids sec de la préparation utilisée.

La méthode manométrique présente des inconvénients. D'abord on constate que l'activité ainsi définie n'est proportionnelle à la quantité d'enzyme ajoutée que jusqu'à 5 %; il n'est donc pas possible d'effectuer des mesures si l'on dispose de fortes activités diastasiques, ou bien il faut diluer à l'extrême, ce qui peut être gênant. De plus, l'unité ainsi définie est tout à fait arbitraire. KIESE et HASTINGS [103] préféraient calculer l'activité par une mesure de la constante de vitesse. VAN GOOR entreprit de perfectionner la méthode et cela le conduisit à construire l'appareil dont la figure 17 représente le schéma [85].

Les produits dont le mélange donne naissance au CO₂ sont placés sur la lame de verre D. Quand le moteur, qui tourne d'emblée à 1 200 tours/minute, commence à fonctionner, les liquides se mélangent. Le gaz dégagé est recueilli dans un tube capillaire. Une goutte de pétrole se déplace dans ce tube, et ses déplacements sont enregistrés automatiquement par une caméra. La mesure s'effectue à pression constante. VAN GOOR utilisait les solutions suivantes : 0,1 cm³ de CO₃NaH 0,1 M et 0,5 cm³ de PO₄NaH₂ 0,02 M. Le vase où s'opérait le mélange était placé dans de la glace pilée et cela permettait d'opérer à 0°.

Le montage de VAN GOOR semble réaliser le maximum de précision. Mais VALLÉE et ALTSCHULE [158] le trouvent, à juste titre, compliqué. Il faut ajouter que l'utilisa-

tion d'aussi faibles quantités de liquide, souhaitable en général, doit être, dans les conditions où VAN GOOR les emploie, une source d'erreur. A ce point de vue, la boat-method de MELDRUM et ROUGHTON reste la plus simple et la meilleure. C'est aussi l'avis de CLARK (*loc. cit.*).

Quelques modifications lui ont cependant été apportées : LEINER (*in* VAN GOOR) a remplacé le manomètre de BARCROFT par un manomètre de WARBURG, beaucoup plus sensible; J. MAETZ (1), a remplacé la lame de verre par des cupules légèrement inclinées sur l'axe. L'axe se termine par des palettes de verre disposées en croix. Quand le moteur tourne, la force centrifuge projette les liquides contre la paroi de l'appareil. Le mélange

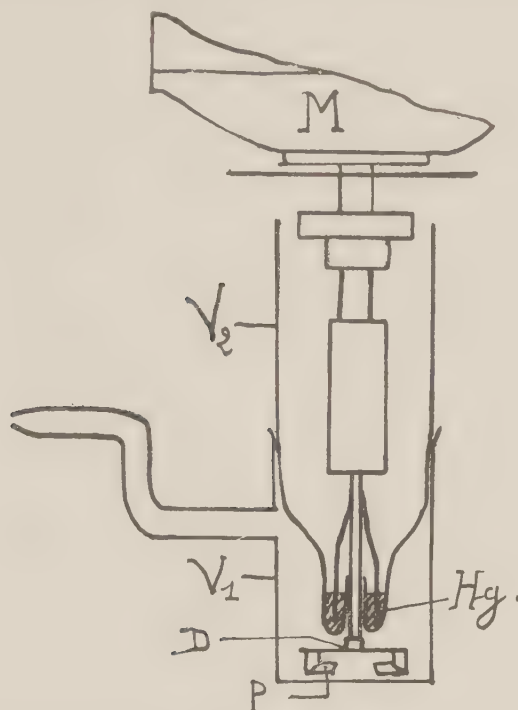


FIG. 17.

Appareil de Van Goor.

P., palette;
D., lame de verre;
V₁, V₂, vases;
M., moteur.

est ensuite facilité par le brassage des palettes. L'étanchéité est assurée par une presse-étoupe.

Cet appareil est aussi compliqué que celui de VAN GOOR. De plus, le brassage violent contrarie la manifestation normale de certaines réactions; le dégazage, dans ce système, ne provient pas de l'agitation, car il n'y a pas ici d'agitation véritable. Enfin, MITCHELL, POZZANI et FESSENDEN [134] ont indiqué un moyen très simple d'utiliser la « boat-method », en évaluant la *constante de vitesse* de la réaction catalysée et non plus le « rendement en CO₂ ». L'activité s'exprime alors par : $K_d = \frac{K_c - K_o}{C}$; où K_d traduit la concentration en diastase, K_c étant la constante de vitesse de la réaction catalysée, K_o celle du témoin, C la concentration de l'anhydrase dans la solution. Les mêmes auteurs ont vérifié expérimentalement que K_d est une fonction linéaire de la concentration en enzyme pour les valeurs qu'ils ont eu la possibilité d'étudier. Ce procédé a été universellement adopté.

(1) MAETZ (JEAN) : Un appareil pour la mesure de l'anhydrase-carbonique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, nos 9-10, 1950, pp. 830-834.

II. — Mise au point d'une nouvelle technique de mesure.

Toutes les techniques de mesure s'inspirent donc des méthodes de BRINKMAN et de MELDRUM et ROUGHTON.

La méthode colorimétrique, contrairement à ce que MAETZ en a dit (124), n'est pas précise. D'abord parce que le bleu de bromothymol inhibe 50 % de l'enzyme à la concentration de 10^{-4} M et le rouge de phénol 10 à 25 % à la même concentration ; ensuite parce que les mesures ne peuvent plus être effectuées si l'on expérimente sur des extraits de tissu colorés.

La méthode volumétrique de VAN GOOR était critiquable; d'autre part il était souhaitable d'exprimer les activités diastasiques en unités MITCHELL, qui ont seules une signification, et cela s'accordait avec la mise en œuvre d'une méthode manométrique, la « boat-method » surtout. Mais, pour opérer sur de plus faibles quantités, donc avec plus de précision, je fus amené à construire un nouveau modèle de mélangeur, celui que représente la figure 19. Le montage principal auquel il s'adapte est celui de la figure 18. Ce montage a été effectué sur un appareil de WARBURG provisoirement désaffecté. Il a fonctionné à l'Ecole Normale Supérieure depuis le mois de janvier 1947.

A. — DESCRIPTION DE L'APPAREIL

Pour obtenir un dégagement de CO_2 , on mélange 2 solutions : l'une, de phosphate monosodique, PO_4NaH_2 à la concentration $\frac{\text{M}}{8}$, l'autre de bicarbonate de sodium, CO_3NaH $\frac{\text{M}}{8}$, en présence de soude NaOH $\frac{\text{N}}{50}$. Le bicarbonate de sodium est solubilisé par la soude. Le mélange s'effectue dans un tube à essai en verre assez épais, muni d'un ajutage latéral (fig. 19). Le phosphate et l'eau distillée, en quantités équivalentes, sont placés au fond du tube. Le bicarbonate remplit la cupule qui se trouve à l'extrémité du bouchon rodé latéral. Par construction, la première cupule que j'avais fait fabriquer avait un volume de $0,58 \text{ cm}^3$, et j'ai gardé cette valeur. Quand la cupule est bien pleine, on peut la retourner : le liquide reste suspendu à l'intérieur, grâce à la tension superficielle et aussi à la pression atmosphérique. Il est donc facile, après le remplissage, de glisser le bouchon rodé latéral, légèrement graissé, dans sa gaine et de le tourner, sans pour cela renverser le bicarbonate. On secoue le mélangeur au moment choisi, le bicarbonate tombe et se décompose, sous l'action des $0,58 \text{ cm}^3$ du phosphate, mêlés à $0,58 \text{ cm}^3$ d'eau distillée (témoin) ou de liquide diastasique. Le flacon est relié à l'une des branches d'un manomètre de WARBURG par l'intermédiaire d'un tuyau de caoutchouc à vide (fig. 18). Le volume total représenté par le mélangeur, le tuyau de caoutchouc à vide et la branche droite du manomètre est de 12 cm^3 environ. Le bouchon rodé supérieur est muni de 2 ergots de verre que l'on rattache, pendant l'agitation, à des papillons métalliques; ceux-ci font partie du dispositif de fixation du tube sur l'appareil d'agitation.

L'agitation, automatique, se fait verticalement, grâce à un système de transmission par poulies reliées à l'axe d'un moteur. Il fallait, bien entendu, opérer à température constante; on avait surtout travaillé à 0° (VAN GOOR, notamment), ou à 15° (MELDRUM et

ROUGHTON...). ALTSCHULE et LEWIS (*in* VALLÉE et ALTSCHULE, *loc. cit.*) avaient récemment proposé de faire les mesures à 38° (pour des études thérapeutiques).

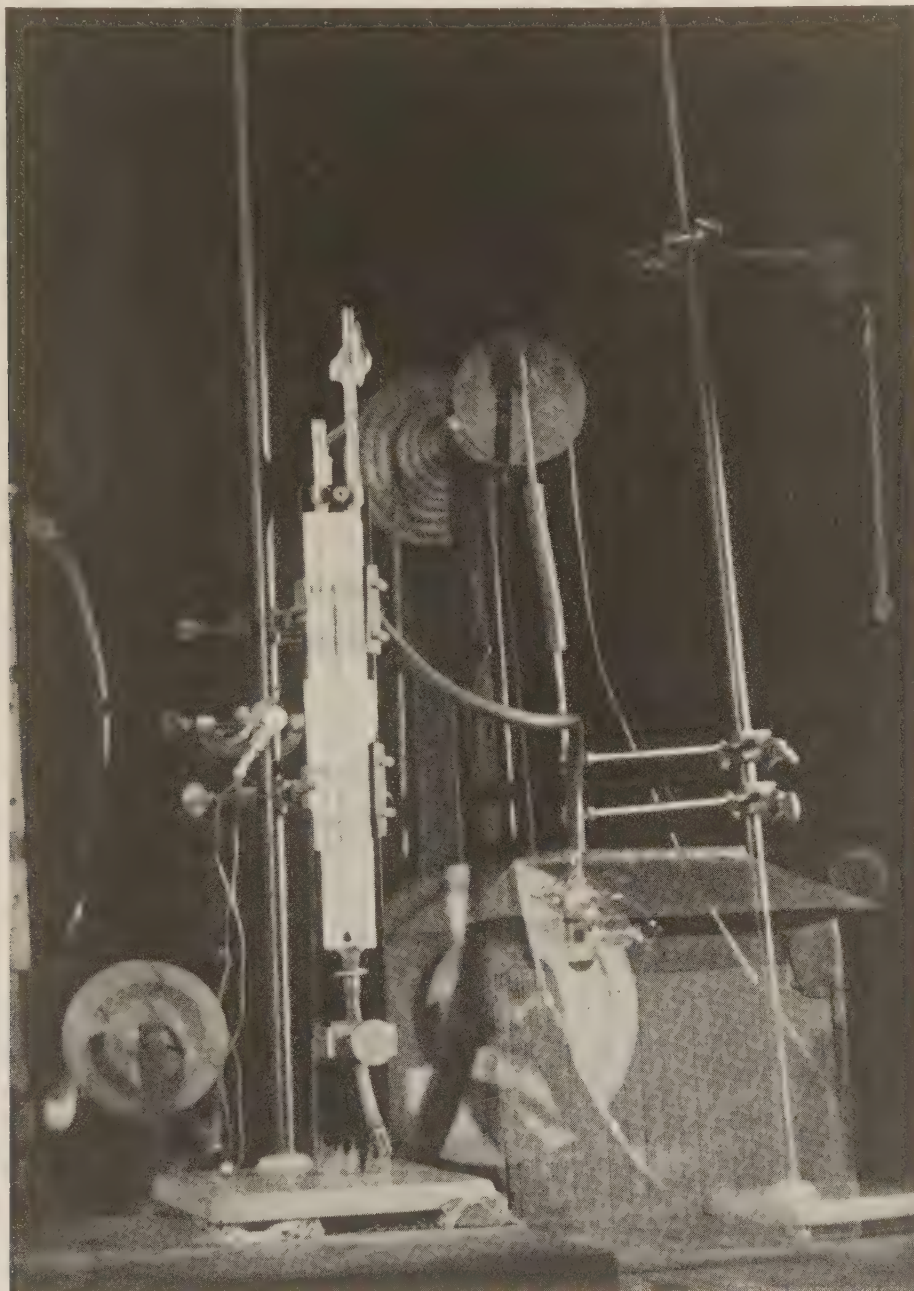


FIG. 18. — Appareil destiné à doser l'activité de l'anhydrase-carbonique.
La cuve thermostat a été photographiée en surimpression pour donner une idée de l'ensemble du dispositif.

Au point de vue strictement expérimental, il était préférable d'opérer à basse température; la sensibilité des mesures y est plus grande puisque le Q_{10} est plus élevé aux basses

températures qu'aux températures moyennes ou aux fortes températures. C'est d'ailleurs le reproche que VALLÉE et ALTSCHULE font aux mesures réalisées à 0°...

Cependant le dispositif que j'ai utilisé ne me permettait pas de travailler à 0° exactement : il aurait fallu que le mélangeur soit plongé dans de la glace fondante et cela n'était pas conciliable avec l'agitation. On peut tourner la difficulté : il suffit d'abord de placer au fond d'une cuve thermostat un panier métallique grillagé, préalablement rempli de glace, et d'y verser de l'eau froide en quantité suffisante. La glace fondante est à 0°, mais on se rapproche de 4° à la surface. L'eau de la surface a donc tendance à descendre et celle du fond à monter. On facilite le mélange à l'aide d'un agitateur (que l'on aperçoit à droite de la figure 18 fixé à la partie inférieure d'un petit moteur élec-

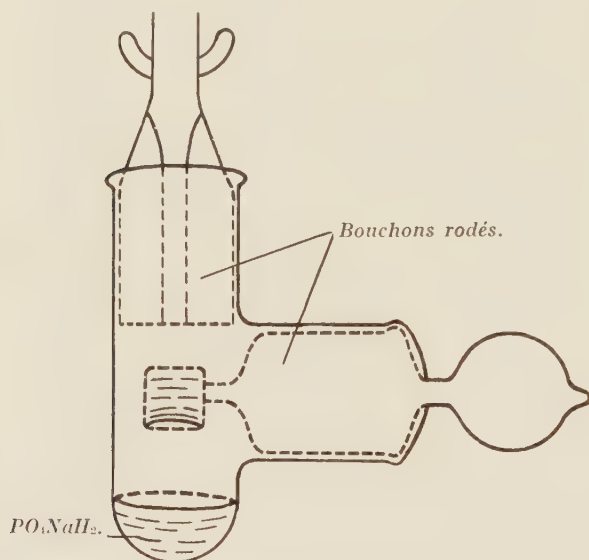
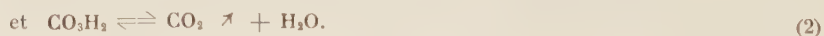


FIG. 19.

Schéma
montrant la structure
du mélangeur
de la figure 18
(les ergots sont reliés
par des élastiques
aux papillons métalliques
de la bague d'aluminium
qui fixe l'appareil
sur
le dispositif de l'ensemble;
cf. fig. 18).

trique). Dans ces conditions, l'eau contenue dans la marmite descend facilement à 0°5 et se maintient sans précautions spéciales entre 1° et 2°. La température remonte lentement quand la glace est fondue. Mais, avant de la renouveler, il est possible de travailler pendant 3 heures au-dessous de 2°. Le mélangeur plonge complètement dans l'eau. Quand l'équilibre de température est atteint entre les liquides intérieurs et l'eau glacée (il suffit de 2 ou 3 minutes pour obtenir ce résultat), on met l'appareil en marche.

Le bicarbonate et le phosphate sont rapidement et totalement mélangés : la réaction est celle que FLORKIN (1935 et 1941), et MAETZ après lui (1946) avaient utilisé :



La première réaction est rapide, car c'est une réaction d'ions. La seconde est lente et peut être accélérée par la diastase. En réalité (1) ne représente qu'un schéma, car, dans les conditions où j'opère, en présence de soude, il y a un mélange complexe de $\text{CO}_3 \text{ NaH}$ et $\text{CO}_3 \text{ Na}_2$, qui sont décomposés par le phosphate acide, de sorte que la solution contient des ions CO_3^- et $\text{CO}_3 \text{ H}^-$, dont la décomposition commande la vitesse de réaction en même temps que la réaction (2). Ce que l'on observe en recueillant le gaz carbonique est la résultante de ces actions.

Le CO_2 arrive dans la branche droite du manomètre de WARBURG. Le liquide manométrique sur lequel s'exerce la pression du gaz est un liquide à base d'extraits biliaires (liquide de BRODIE), auquel on ajoute du vert de méthyle pour faciliter les lectures sur le fond jaune ou rouge du papier millimétré. Les lectures se font de 15 s. en 15 s., à volume constant. Au fur et à mesure que le gaz se dégage, l'expérimentateur tourne la vis de réglage qui appuie sur le réservoir du manomètre et maintient constant le niveau du liquide dans la branche de droite. Une autre personne fait les lectures de pression du côté gauche. Toutes les 15 s., une petite ampoule électrique, placée à mi-hauteur du manomètre, s'allume grâce à un dispositif très simple : elle est reliée à une batterie d'accus et à une horloge électrique qui donne un contact toutes les 15 s. Il n'est donc pas nécessaire de regarder l'ampoule, la lumière se place d'elle-même dans le champ visuel du lecteur au moment voulu (fig. 18).

B. — LES MODALITÉS D'UTILISATION.

a) CHOIX D'UNE MÉTHODE DE MESURE. — Il n'est pas possible, sur un appareil comme celui-ci, de repérer le moment précis du départ de la réaction, puisque l'on ne voit pas les liquides quand l'expérience commence. Mais cela n'est pas indispensable si l'on évalue l'activité diastasique par la méthode de MITCHELL et de ses collaborateurs. Ces auteurs avaient remarqué que l'on peut assimiler la décomposition du CO_3NaH , même en présence de soude, par le phosphate monosodique, à une réaction unimoléculaire, et comme GUGGENHEIM [92] avait montré qu'il est facile de calculer la constante de vitesse d'une réaction unimoléculaire en repérant à des intervalles de temps égaux la pression du gaz dégagé (si la réaction en libère), sans se préoccuper du départ ni de la fin de l'expérience, MITCHELL, POZZANI, FESSENDEN, appliquèrent ce résultat à la mesure de l'activité diastasique. L'appareil dont ils se sont servi était celui de MELDRUM et ROUGHTON, mais leur solution de CO_3NaH renfermait 0,15 molécule/litre en présence de soude à 0,0222 mol./litre. Les mesures ont été faites à 15°.

On note 12 repères de pression à des intervalles de temps égaux, 15 s. en l'occurrence. Le 1^{er} repère est pris 30 à 45 s. après le mélange. Soient : $X_1, X_2 \dots X_{12}$ ces repères. On calcule les différences : $(x_7 - x_1), (x_8 - x_2) \dots (x_{12} - x_6)$. Si l'on trace la courbe des $\log. (x_n - x_{n-6})$ en fonction du temps, on obtient une droite dont le coefficient angulaire $\times 2,303$ (1) donne la constante de vitesse, k_0 , de la réaction. Si l'on mesure dans les mêmes conditions k_c , constante de vitesse de la réaction catalysée, on peut connaître $k_d = k_c - k_0$ qui est une fonction linéaire de la concentration en diastase, de sorte que kd , ramené à l'unité de matériel catalysé et à l'unité de matériel catalyseur employé : cm^3 pour les liquides, gramme pour les solides, exprime l'activité de l'anhydrase-carbonique.

La définition de l'unité d'activité était contenue dans ces explications, mais n'avait pas été explicitée par les auteurs. Il était souhaitable de préciser et je crois que l'on peut donner de cette unité la définition suivante : c'est la quantité de diastase qui, ajoutée à l'unité de matériel catalysé, donne à la constante de vitesse de la réaction catalysée, une valeur supérieure

(1) 2,303 représente la valeur numérique du logarithme népérien de 10.

d'une unité à celle de la constante de vitesse de la réaction témoin, effectuée dans les mêmes conditions expérimentales (1).

MITCHELL avait admis comme une évidence que la constante de vitesse telle qu'il la mesurait était la même que celle des réactions unimoléculaires définies par GUGGENHEIM. Mais il pouvait être intéressant de le prouver. Le calcul que l'on trouvera à la fin de ce chapitre, parmi les tableaux et notes annexes montre qu'il en est bien ainsi; ce calcul a l'avantage de justifier théoriquement le processus expérimental de mesure de la constante de vitesse.

b) DÉTERMINATION DE k_0 . — k_0 , dans mes expériences, correspondait donc à la constante de vitesse de la réaction de décomposition de : $0,58 \text{ cm}^3 \cdot \text{CO}_3\text{NaH} \frac{\text{M}}{8}$ dissous dans de la soude $\frac{\text{N}}{50}$ par $0,58 \text{ cm}^3$ de $\text{Po}^4\text{NaH}_2 \frac{\text{M}}{8}$ additionné de $0,58 \text{ cm}^3$ d'eau distillée. Le pH de cette solution est de 6,78 après le mélange; il remonte à 7,07 après l'agitation et le départ du CO_2 .

Quand la réaction est assez lente, comme c'est le cas avec le témoin, on peut noter facilement 14 repères de pression. On suit, en observant le manomètre, les diverses phases de la réaction. D'abord la chute du bicarbonate provoque un déplacement d'air à l'intérieur du mélangeur et le liquide baisse dans la branche droite du manomètre. Il remonte aussitôt après; cela correspond sans doute au rétablissement de l'équilibre; puis il redescend régulièrement sous la poussée du CO_2 qui commence à se dégager. On rétablit alors le niveau avec la vis de réglage. Mais le phénomène ne se déroule pas toujours ainsi; il arrive que le liquide descende d'abord brusquement et ne remonte pas. Ou bien il remonte plus haut que son point de départ, comme s'il était légèrement aspiré. De toutes façons, quand on coupe la communication entre l'air contenu dans l'appareil et l'extérieur en fermant le robinet de verre du manomètre de WARBURG (fig. 18), le liquide remonte spontanément; cela s'explique facilement, car le mélangeur est plongé dans de l'eau glacée et le manomètre de WARBURG est à la température ordinaire. Mais les autres variations ne s'expliquent pas. On devrait s'attendre, après le déplacement d'air provoqué par la chute du bicarbonate à voir le liquide manométrique remonter, sous l'effet, d'une part du rétablissement de l'équilibre, d'autre part de la diminution de volume que détermine la différence de température entre les deux parties de l'appareil, pendant le temps de « latence » qui précède le dégagement du CO_2 . Ce temps de latence est évidemment variable d'une expérience à l'autre, bien que l'on puisse admettre que les deux liquides : bicarbonate et phosphate sont complètement et rapidement mélangés, ce qu'il est facile de constater après un essai effectué en dehors de la cuve thermostat. Mais, indépendamment de certains impondérables, il y a des causes de variation que l'on peut déceler : d'abord, je n'ai pas chronométré le temps pendant lequel il fallait attendre que l'équilibre de température soit réalisé entre l'eau glacée et l'intérieur du mélangeur, pour des raisons de commodité qu'il est facile de concevoir; de plus, l'expérience se déroulait parfois à $0^\circ 6$, mais dans d'autres cas c'était à 2 ou 3° . Il est évident que, si le mélange phosphate-eau distillée acquiert rapidement la même température que l'eau glacée dont il n'est séparé que par le verre du mélangeur, il n'en est pas de même pour le bicarbonate qui n'est pas au contact de la paroi de verre. Il en résulte une différence de température, légère sans doute, mais effective, entre ces deux liquides; cette différence varie forcément d'une expérience à

(1) Voir les précisions dans les pages qui suivent.

l'autre, et les conditions de dégagement du CO_2 subissent de ce fait des variations. Si l'on ajoute à cela qu'il y a une chaleur de réaction proprement dite et qu'elle doit influencer sur le phénomène, on peut s'attendre à trouver des écarts entre deux mesures. MELDRUM et ROUGHTON d'abord, tous les auteurs qui ont utilisé la boat-method ensuite, avaient noté des « irrégularités » au début du dégagement, mais ne les avaient pas nettement expliquées. Pour ne pas être gênés, MELDRUM et ROUGHTON ne commençaient à noter les pressions qu'après les 10 premières secondes qui suivent le départ de la réaction. MITCHELL et coll. attendent davantage : 30-45 s. Pour ma part, je ne me suis absolument pas soucié du temps écoulé entre le moment du mélange des liquides et celui où je notai le premier repère. J'attendais seulement que la réaction fût en pleine marche; cela ne se réalisait évidemment, quelles que fussent les variations du début, que lorsque le CO_2 dégagé, ayant saturé la solution mère en s'y dissolvant, diffusait à l'extérieur. Le calcul que j'ai développé précédemment justifie pleinement cette manière d'opérer. Je me suis efforcé d'avoir 12 repères à chaque mesure, sauf quand la réaction était trop rapide. Cependant je n'ai jamais utilisé de calculs avec moins de 6 repères, autrement dit de 3 différences ($x_n - x_{n-6}$). Cela est indispensable pour obtenir une droite significative (fig. 24). On porte en ordonnée : $\log (x_n - x_{n-6})$, et en abscisse des points représentant les intervalles de temps écoulé entre deux mesures successives = 15 s. La pente de cette droite, changée de signe, est égale à ko et se calcule donc par la formule :

$$ko = \frac{(\text{Log } (x_n - x_{n-6}) - \text{Log } (x_{n+1} - x_{n+1-6})) \times 2,303}{15}.$$

La pente de la droite constitue donc une moyenne graphique entre les $\log. (x_n - x_{n-6})$. Elle est d'autant plus significative qu'il y a plus de points pour la délimiter.

Je m'aperçus rapidement que les ko pouvaient varier du simple au double dans des conditions expérimentales apparemment identiques (1). Pourtant la méthode est parfaitement utilisable, mais à condition de connaître la limite des variations possibles. Pour arriver à ce résultat, j'entrepris de faire une étude statistique aux températures que l'appareil m'imposait.

J'ai volontairement cherché à multiplier les causes de variation : j'ai placé les flacons au frigidaire ou je les ai laissés à la température ordinaire, ce qui facilitait le développement des germes, surtout dans la solution de phosphate. J'ai renouvelé les solutions tous les 5 ou 6 jours, et les ai utilisées avec ou sans germes. Seule la vitesse d'agitation est restée aussi constante que possible; cependant, il est certain qu'elle a varié légèrement d'une journée à l'autre. En principe je m'en suis tenu à 150 battements à la minute.

Les températures ont été repérées au 1/10 de degré, au même point de la cuve. Les mesures ont été effectuées avec 3 mélangeurs différents (de même capacité bien entendu), pendant une période de 3 mois.

Les expériences ont été réalisées jusqu'à 7°5, mais quand j'ai dû évaluer l'activité diastasique d'un liquide ou d'un tissu, je n'ai jamais poussé au delà de 3°. La valeur de ko que l'on compare à kc est celle que donne la *moyenne arithmétique* des ko trouvés de degré en degré; kc traduira l'existence d'anhydrase dans la solution étudiée, s'il est significativement différent de ko .

(1) Je n'ai pas envisagé l'écart de température entre le gaz contenu dans le mélangeur et celui qui remplit la branche droite du manomètre (température de la pièce), comme une cause de variation susceptible d'influer sur ko , car la cinétique montre qu'il n'en est rien.

Les formules habituelles de la statistique permettent de juger si cette différence est effectivement significative : la *dispersion* de l'ensemble des valeurs d'une variable x autour de sa moyenne est mesurée par σ^2 , avec :

$$\sigma^2 = \frac{\sum (x - m)^2}{n - 1}.$$

Dans cette équation, m et n représentent : m = la moyenne arithmétique et n = le nombre de valeurs considérées; σ est l'écart *type* de la distribution.

Une valeur x' ne pourra être considérée comme faisant partie de l'ensemble précédent, de moyenne m et d'écart type σ que si elle diffère de m de plus de 2σ (sécurité : 95 %).

On peut rappeler en effet que l'intervalle compris entre $m + \sigma$ et $m - \sigma$ comprend 66 % des résultats et celui qui existe entre $m + 2\sigma$ et $m - 2\sigma$, 95 %.

Le tableau V résume les résultats de 151 expériences (Cf. tableau XII, *in* Tableaux et notes annexes).

TABLEAU V

Zone de température	k_0 moyen (calculé)	σ	Nombre de mesures
0,5 — 1°	0,0060	0,0013	40
0,5 — 2°	0,0063	0,0012	92
1 — 2°	0,0065	0,0011	52
1 — 3°	0,0066	0,0011	79
2 — 3°	0,0067 0,0070 (graphique).	0,0011	27
2 — 4°	0,0070	0,0011	41
3 — 4°	0,0074	0,0011	14
4 — 7°5	0,0078	0,0009	18

Si l'on porte sur du papier quadrillé les k_0 en ordonnée, et en abscisse les températures correspondantes à 1/10 de degré près, on obtient une représentation graphique de la dispersion des résultats (fig. 20). La courbe moyenne devient une droite si l'on porte ces mêmes résultats sur du papier semi-logarithmique (fig. 21). Enfin si l'on trace les courbes $= k_0 \text{ moyen} = f(\theta m.)$ (tempér.) sur papier quadrillé ordinaire (fig. 22) et sur papier semi-logarithmique (fig. 23), en y ajoutant les courbes $k_0 m \pm 2\sigma$, on constate nettement que l'écart entre $k_0 m + 2\sigma$ et $k_0 m - 2\sigma$ diminue quand la température s'élève, ce qui revient à dire, puisque la constante de vitesse s'élève avec la température, que les mesures les plus précises sont celles qui sont effectuées sur des réactions rapides. Cette observation est facile à vérifier sur le tableau V lui-même puisque les valeurs de σ diminuent quand celles de k_0 augmentent. Comparés aux k_0 correspondants, les σ sont élevés : la précision des mesures est faible dans l'ensemble; mais cela aussi prouve qu'on n'a pas intérêt à opérer au voisinage de k_0 moyen. Par contre, plus k_c sera élevé, moins les variations de k_0 influenceront sur la précision de la mesure ($k_c - k_0 m$); il est donc évident que cette méthode s'oppose à celle de MELDRUM et ROUGHTON qui opéraient systématiquement à de faibles concentrations en diastase. D'autre part, on ne risque pas de sortir d'une zone où $(k_c - k_0)$ ne serait plus proportionnel à la concentration en diastase, parce que la théorie et l'expérience prouvent que kd , nous l'avons vu, est une fonction linéaire de cette concentration, et que je me suis imposé d'avoir au minimum

6 repères de pression pour tracer une courbe; le manomètre ayant 22 cm de hauteur utilisable, les mesures restent obligatoirement dans les limites optima.

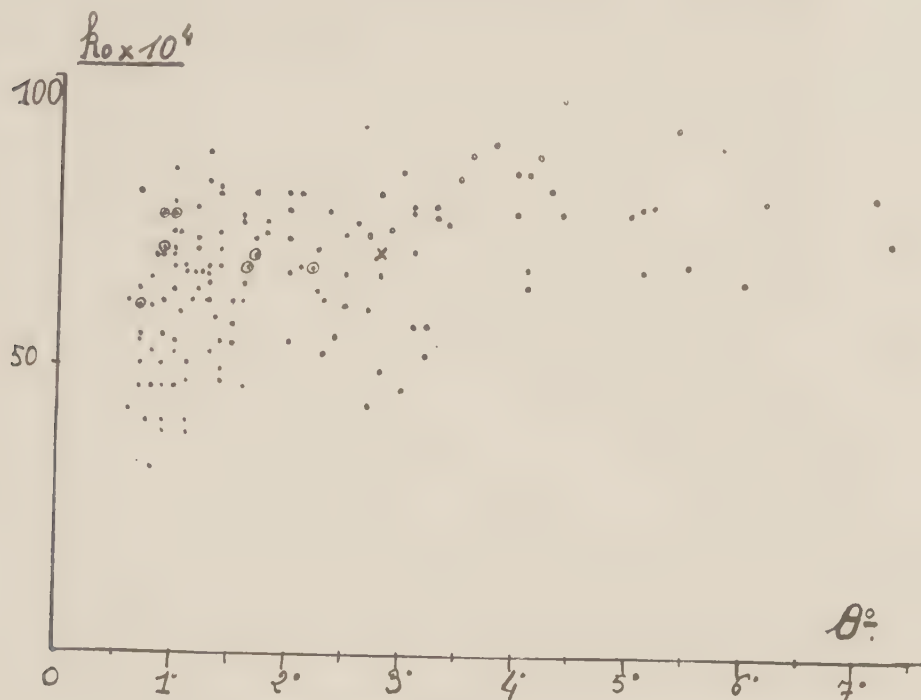


FIG. 20. — $K_0 = f(\theta)$. o, point double; X, point triple; θ , température. Papier quadrillé.

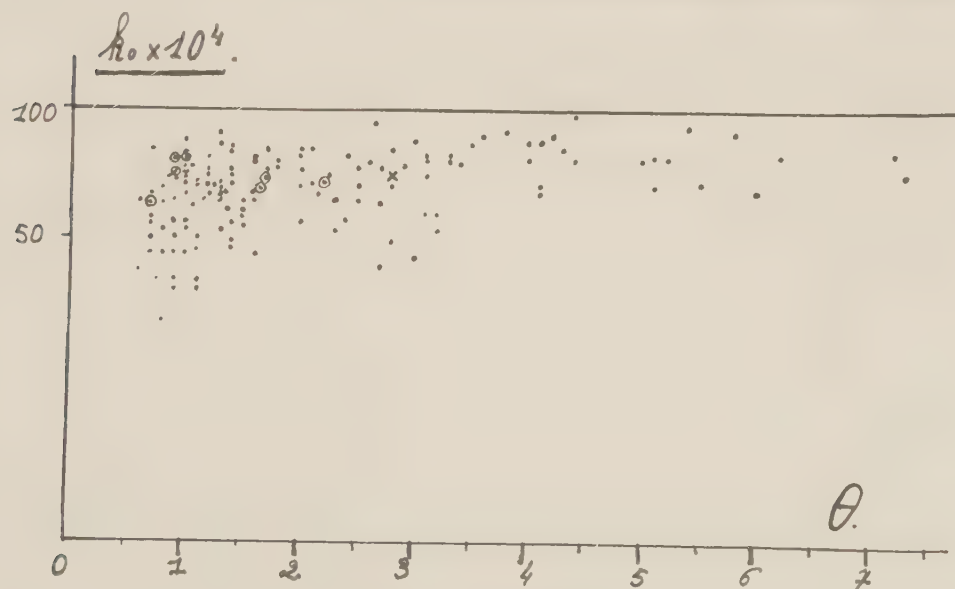


FIG. 21. — $K_0 = f(\theta)$. Même légende que pour la figure 20. Papier semi-logarithmique.

c) INFLUENCE DE LA VITESSE D'AGITATION. — La constante k que l'on mesure est évidemment une constante expérimentale; on l'identifie pratiquement à la véritable

constante de vitesse de la réaction étudiée. Elle est déterminée par la vitesse de réaction proprement dite et par la vitesse de diffusion du CO_2 formé dans le liquide. On pouvait

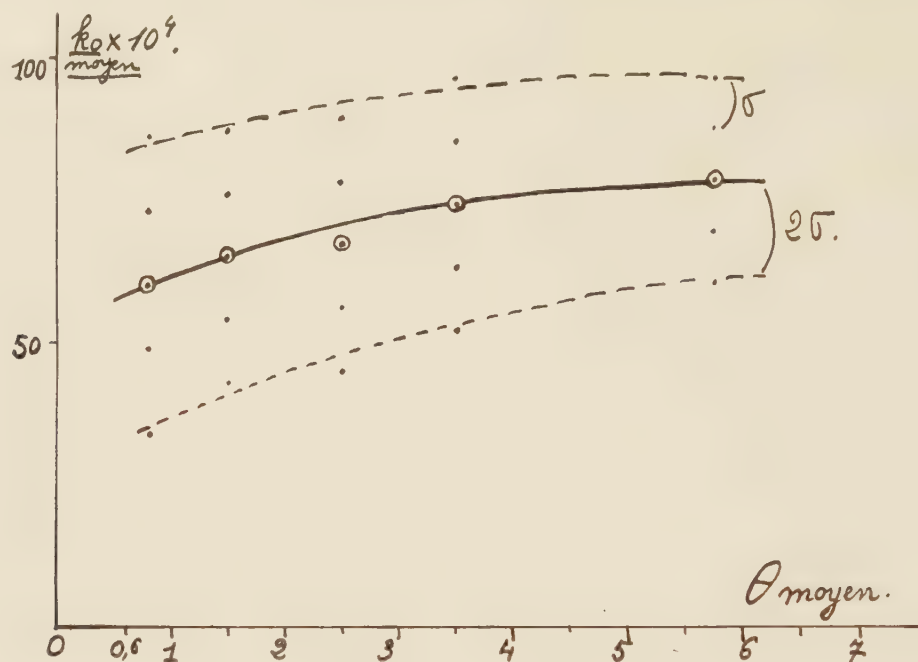


FIG. 22. — $K_0 \text{ moyen} = f(\theta \text{ moy.})$. Papier quadrillé.

On remarque que, de 2-3°, le k_{0m} calculé est de 0,0067, et le k_0 mesuré graphiquement, de 0,0070.

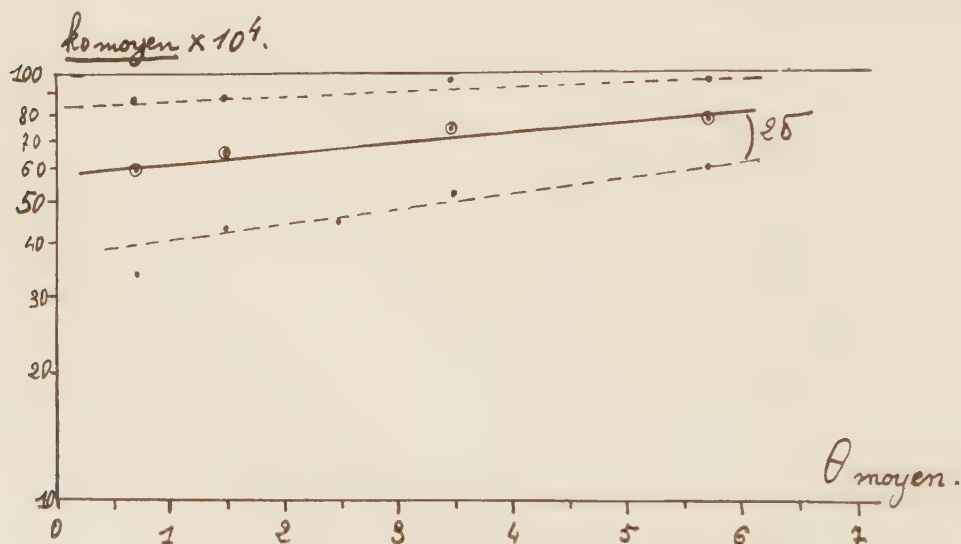
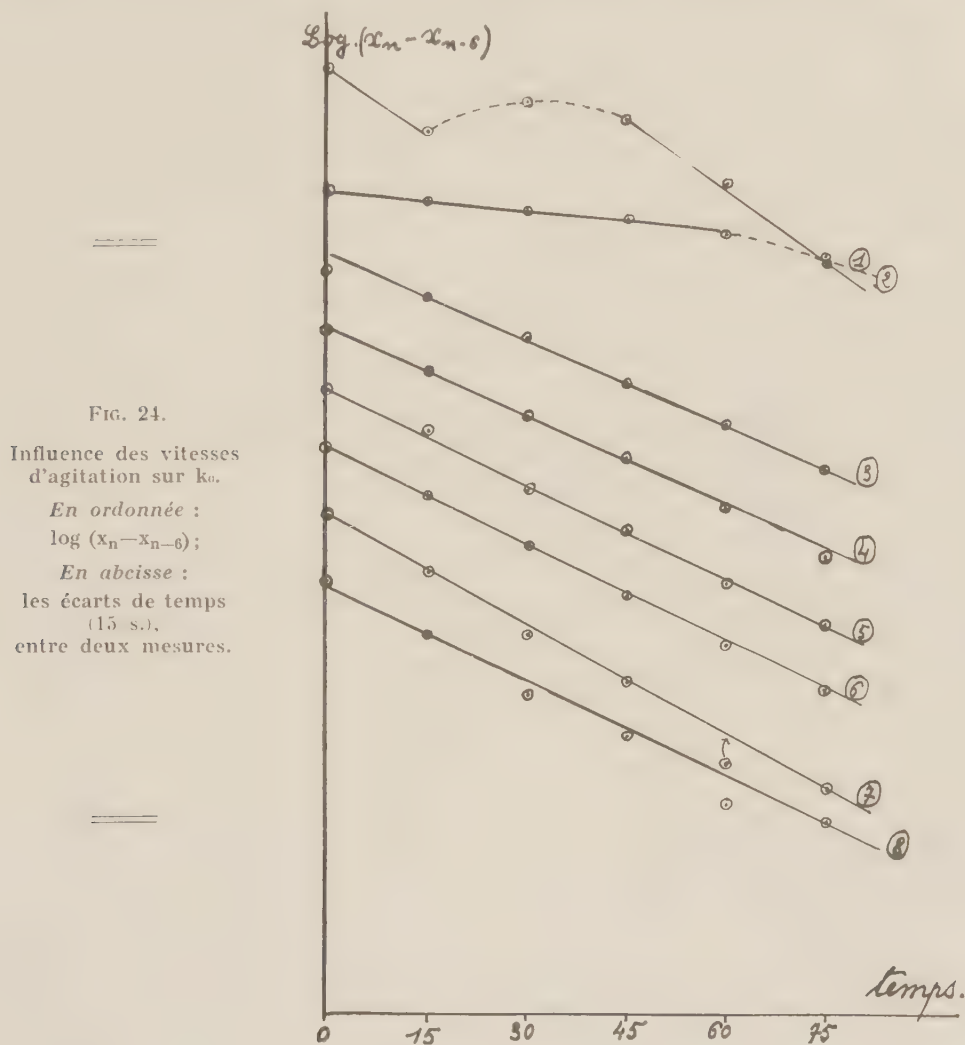


FIG. 23. — $K_0 \text{ moy.} = f(\theta \text{ moy.})$. Papier semi-logarithmique.

donc s'attendre à ce que la vitesse d'agitation influe sur la valeur de k_0 , puisque le dégazage de la solution intervient dans le résultat final et que l'agitation favorise ce dégazage. Aux faibles vitesses d'agitation: moins de 150 battements/minute, on obtient des courbes

irrégulières, sans doute parce que le mélange n'est pratiquement pas secoué. Aux vitesses maxima dont je pouvais disposer, c'est-à-dire à 250 battements/minute, tout l'appareil est animé de trépidations, de sorte que j'étais obligé de travailler à des vitesses d'agitation comprises entre 150 et 250 battements/minute. Une étude plus précise montre que la vitesse d'agitation, avec cet appareil, n'influe pas sur k_0 ; ou si cette influence existe, du fait que le liquide est simplement secoué régulièrement et non brassé par un agitateur, elle se confond avec les variations qui ont été signalées au paragraphe précédent. Il y a



cependant un seuil, à 150 battements/minute, mais cela s'explique parce que les dégagements gazeux se font, au-dessous, très irrégulièrement, comme le montrent les courbes (1) et (2) (fig. 24) à 130 coups/minute. On trouve pour ces 2 essais :

A 150 c/m, $k_0 = 0,0070$ et $0,0069$ (courbes 3 et 4) — 200 c/m, $k_0 = 0,0073$ et $0,0073$ (courbes 5 et 6). — 250 c/m, $k_0 = 0,0086$ et $0,0070$ (courbes 7 et 8).

Ces mesures sont faites de 1 à 2° ($k_0 m = 0,0065$), mais on peut remarquer, dans le tableau n° 12, qu'il y a, pour des valeurs obtenues à 150 c/m, un $k_0 = 0,0087$ entre 1

et 2°. Par conséquent, la vitesse d'agitation ne semble pas influencer sur la valeur des constantes de vitesse obtenues dans les conditions expérimentales où je me suis placé.

d) **PRESSIION DU GAZ DÉGAGÉ ET CONSTANCE DE VITESSE.** — Si l'on examine les pressions relevées dans les deux expériences effectuées à 150 c/m, et dont la constante de vitesse est la même : 0,0070 et 0,0069, on constate qu'il s'est dégagé en 13 intervalles de 15 s., une quantité de gaz correspondant, dans un cas à 134 mm de pression, dans l'autre à 154 mm, malgré un point de départ légèrement différent (courbes 3 et 4, fig. 24).

La courbe n° 5 est construite d'après le relevé indiqué dans le tableau ci-dessous ; elle donne un $k_0 = 0,0073$. Le départ est à 12 (13 pour la courbe n° 4) et l'arrivée à 146, contre 167 à l'autre relevé, dont le $k_0 = 0,0069$. (Cf. tableau V).

Des exemples comme ceux-là se rencontrent assez fréquemment en solutions homogènes ; ils sont encore plus fréquents en présence de diastase ou d'extraits diastasiques, plus accentués aussi ; par conséquent on ne saurait présumer de la valeur d'une constante de vitesse par la quantité de gaz dégagé en un temps donné.

Cette affirmation paradoxale se justifie théoriquement : puisque k se calcule à l'aide des $(x_n - x_{n-6})$, on peut donner à x_n , x_{n+1} ,... une infinité de valeurs absolues qui caractériseront un « rendement » en CO_2 faible ou élevé, mais qui n'empêcheront pas, d'une série à la suivante, que $(x_n - x_{n-6}) - (x_{n+1} - x_{(n+1)-6})$ garde la même valeur, donc que ko ou kc ne varient pas. Il reste à expliquer que ce phénomène puisse effectivement se produire. Il se passe sans doute « quelque chose » au début de l'expérience, quand les deux liquides se mélangent. Mais s'il en est ainsi, il faudrait savoir pourquoi les modalités du mélange initial se répercutent sur l'ensemble de la réaction ? Je ne suis pas en mesure de l'expliquer.

TABLEAU V

N ^{os}	Pressions	N ^{os}	Pressions	N ^{os}	Pressions
1.	4	1.	13	1.	12
2.	17	2.	33	2.	30
3.	32	3.	52	3.	48
4.	45	4.	68	4.	62
5.	59	5.	83	5.	75
6.	72	6.	98	6.	86
7.	84	7.	110	7.	97
8.	94	8.	121	8.	107
9.	102	9.	131	9.	115
10.	111	10.	140	10.	123
11.	119	11.	147	11.	129
12.	126	12.	155	12.	135
13.	133	13.	161	13.	141
14.	138	14.	167	14.	146
Courbe n° 3.		Courbe n° 4.		Courbe n° 5.	

Il arrive que l'on obtienne des kc très élevés, avec un rendement en CO_2 très faible ; la série du tableau V bis a été obtenue le 24 février 1949, avec un extrait aqueux du manteau de *Patella vulgata* : le kc en est égal à : 0,0202 ($k_0 = 0,0060$).

TABLEAU V bis (à 1° environ).

1.....	13	4.....	91	7.....	124	10.....	137
2.....	46	5.....	105	8.....	130	11.....	140
3.....	72	6.....	116	9.....	134	12.....	141

Pour ma part, je n'ai tenu compte que des constantes de vitesse. Mais l'observation que je viens de faire, d'autres encore qui seront exposées dans les pages suivantes,

montrent combien nos moyens d'investigation sont grossiers et combien il convient d'être prudent dans l'interprétation de mesures effectuées sur des mélanges aussi complexes que les extraits de tissu.

e) INFLUENCE DE LA VISCOSITÉ SUR LA CONSTANTE DE VITESSE MESURÉE. — MOYNIER DE VILLEPOIX (*loc. cit.*) avait pensé que la viscosité des liquides biologiques pouvait influencer la cristallisation du calcaire. MAETZ, de son côté (*loc. cit.*), considérait comme une cause de trouble dans l'utilisation de la boat-method le changement de viscosité des solutions. Il me parut donc nécessaire de régler cette question.

J'ai fait des solutions de viscosité variable en ajoutant à de la glycérine des quantités d'eau croissante (dilutions : 1/2, 1/3, 1/4...). J'ai mesuré la viscosité de ces solutions dans les conditions expérimentales qui sont celles de la mesure des k_0 , c'est-à-dire en mélangeant à parties égales : $\text{PO}_4\text{NaH}_2 \frac{\text{M}}{8}$, $\text{CO}_3\text{NaH} \frac{\text{M}}{8}$ dans $\text{NaOH} \frac{\text{N}}{50}$, et H_2O ou glycérine diluée.

J'ai utilisé le viscosimètre BAUME (fig. 25). La viscosité s'exprime par rapport à celle de l'eau à la température considérée, en *poises* dans le système C. G. S.

La viscosité est donnée par la formule $\eta = Kdt$, où η = viscosité en poises ; K = constante caractéristique du capillaire ; d = densité du liquide ; T = *temps d'écoulement* du liquide entre les 2 repères supérieurs du tube de BAUME. On s'efforce d'avoir des écoulements voisins de 1 minute pour qu'il n'y ait pas de mouvements tourbillonnaires, et pour diminuer l'erreur relative sur la mesure de T.

Sur l'appareil dont je me suis servi, K valait 0,000 311. J'ai mesuré la densité des liquides à l'aide de la balance de MOHR (qui permet d'apprécier le 4^e chiffre après la virgule). Les k_0 des différents mélanges ont été pris aux environs de 2° (1-2°), et chaque mesure a été répétée 3 fois.

Le tableau VI contient les résultats de ces expériences.

TABLEAU VI

Liquide	Densité du mélange	Temps d'écoulement			Viscosité			k_0 (moyennes)
		4°	3°	2°	4°	3°	2°	
$\text{PO}_4\text{NaH}_2 \frac{\text{M}}{8}$ + $\text{CO}_3\text{NaH} \frac{\text{M}}{8}$ (dans $\text{NaOH} \frac{\text{N}}{50}$) + H_2O	1,0066	43 s 9	45 s 4	47 s 3	0,01374	0,01421	0,0143	0,0065
Glycérine 1/10.....	1,0142	47 s 4	49 s 2	50 s 4	0,01495	0,01551	0,01583	0,0066
Glycérine 1/9.....	1,0150	46 s 6	49 s 1	50 s 7	0,01467	0,01549	0,01600	0,0069
Glycérine 1/8.....	1,0158	48 s 4	50 s 1	51 s 6	0,01529	0,01582	0,0163	0,0066
Glycérine 1/7.....	1,0167	48 s 1	51 s 1	52 s 8	0,0152	0,01615	0,01669	0,0061
Glycérine 1/6.....	1,0180	51 s 8	52 s 9	53 s 8	0,01639	0,01674	0,01703	0,0066
Glycérine 1/5.....	1,0216	54 s	55 s 8	56 s 7	0,01715	0,01772	0,01801	0,0068
Glycérine 1/4.....	1,0240	57 s 1	58 s 6	59 s 5	0,01818	0,01866	0,01894	0,0068
Glycérine 1/3.....	1,0325	59 s 1	62 s	62 s 9	0,01897	0,01990	0,02019	0,0066
Glycérine 1/2.....	1,0422	67 s 4	68 s 2	69 s 2	0,02184	0,02210	0,02242	0,0063
Glycérine pure.....	1,0920	123 s 8	129 s 8	133 s 7	0,04476	0,04693	0,04834	0,0046

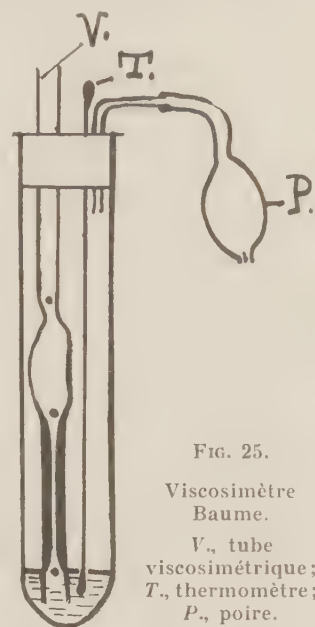


FIG. 25.

Viscosimètre
Baume.V., tube
viscosimétrique;
T., thermomètre;
P., poire.

Il est remarquable de constater que les k_0 sont très voisins, (sauf le dernier cas), alors que la viscosité croît régulièrement avec la quantité de glycérine présente. La dernière valeur du tableau ne prouve pas qu'il y a une influence de la viscosité sur la vitesse de réaction. S'il en était ainsi, on devrait constater une diminution progressive des k_0 depuis le début jusqu'à la fin du tableau. De plus, dans la liste des mesures de k_0 effectuée entre 1 et 2° (Cf. tableau annexe), on trouve des valeurs de $k_0 = 0,0040; 0,0047...$ Il n'est pas certain que la glycérine pure soit mélangée aux solutions de $\text{PO}_4\text{Na H}_2$ et de CO_3NaH de manière homogène, et c'est encore là une cause de trouble. Si l'on considère les résultats d'ensemble, on note que k_0 varie de : 0,0061 à 0,0069; il est donc permis d'affirmer, non seulement que la viscosité n'influence pas la vitesse des réactions, mais encore qu'elle la régularise, puisque l'on trouve sur les témoins des k_0 qui varient de 0,0040 à 0,0087, la moyenne arithmétique se situant à 0,0065. Par conséquent, si l'anhydrase-carbonique joue un rôle dans la cristallisation du calcaire à partir des solutions de bicarbonate de calcium, ce ne sont pas les changements de viscosité du milieu qui pourront orienter la précipitation vers une forme minéralogique plutôt que vers une autre.

f) EVALUATION DES ACTIVITÉS ANHYDRASIQUES. ETALONNAGE DE L'APPAREIL. — Je devais avoir l'occasion, au cours de mes recherches, d'utiliser des préparations diastiques et j'en profitai pour étalonner l'appareil de mesure.

Pour les essais qui ne nécessitaient pas des produits très purs, je me suis servi d'anhydrase-carbonique en poudre, que j'ai préparée en combinant les procédés de MELDRUM et ROUGHTON (*loc. cit.*), et ceux de KEILIN et MANN (*loc. cit.*).

A) On opère sur 2 litres de sang de bœuf, préalablement défibriné. On décante pour séparer le sérum. On lave dans un égal volume de solution saline à 0,9 %. Puis on centrifuge pour séparer les globules du liquide surnageant. On plasmolyse ensuite dans une quantité équivalente d'eau distillée, ce qui nous ramène au volume initial. Selon M. et R., on obtient alors une solution qui contient 0,14 g de poids sec/cm³.

B) On refroidit la solution dans la glace et on ajoute un mélange glacé d'alcool-chloroforme (1 l 8 d'alcool à 90 % et 130 cm³ CHCl_3 , pour 2 litres).

Cette opération s'effectue dans un cristallisateur ou dans un vase cylindrique large. On agite avec une baguette de verre. Il se forme au sein du liquide une masse spongieuse constituée par de l'hémoglobine dénaturée. On presse cette masse qui retient du liquide, on la lave. On fragmente le solide, on lave les morceaux, on filtre. On mélange tous les filtrats. On y ajoute du kieselguhr. On filtre dans un vaste entonnoir de Büchner (30 cm de diamètre), sur filtre couvert de kieselguhr.

On recueille ainsi un liquide jaunâtre clair qui contient, d'après KEILIN et MANN : 2,5 mg/cm³ de poids sec.

c) On peut centrifuger avant la dernière opération. On élimine ainsi quelques impuretés.

Puis, au liquide jaunâtre, qui constitue la solution au chloroforme brut de M. et R., après refroidissement dans la glace ou au frigidaire, on ajoute une solution d'alcool-éther : 250 cm³ alcool à 95° + 800 cm³ éther à 65° (méthode B de MELDRUM et ROUGHTON, 1933).

Il apparaît un précipité blanchâtre qu'on laisse déposer au frigidaire. On filtre sur Büchner ou de préférence on centrifuge. On lave à l'alcool absolu, on sèche dans un dessiccateur à vide. Le produit obtenu est blanchâtre, mêlé de brun.

Je n'ajouterai rien à ce que d'autres ont dit avant moi, en répétant, après l'avoir vérifié, que les solutions de diastase perdent spontanément leur activité, en quelques jours, à la température ordinaire, plus lentement si elles sont conservées au frigidaire.

Les solutions sont inactivées par chauffage à 60°. Si l'on considère que le matériel catalysé est uniquement le CO_3NaH dont on emploie 0,58 cm³ en solution, et si l'on ramène les mesures des constantes de vitesse à l'unité de matériel catalyseur employé (cm³ ou g), le terme « dilution » représentant le nombre de cm³ qui ont servi à diluer 1 cm³ d'une solution trop concentrée pour être utilisée directement, l'activité d'une solution sera représentée par :

$$\frac{kd \times (\text{dilution})}{0,58 \times 0,58} = \frac{kd \times (\text{dilution})}{0,3364} \text{ U/cm}^3.$$

Une des solutions au chloroforme que j'ai préparées avait ainsi une activité de : 0,066 U/cm³. Avec du sang de Poule, j'ai trouvé : 2,719 U/cm³ à 1°. MITCHELL avait trouvé, à 15°, une activité variable de 2 à 5 unités/cm³. La concordance est bonne. Une poudre d'anhydrase-carbonique, préparée en juin 1948 a été examinée en mars 1949.

Les résultats du dosage sont les suivants : le 11 mars 1949 : 189,57 U/g de poudre; le 14 mars 1949 : 161,17 U/g; le 15 mars 1949 : 148,08 U/g.

La solution qui contenait la poudre broyée et dont les activités viennent d'être chiffrées avait été conservée au frigidaire.

Si l'on recherche l'anhydrase-carbonique dans les tissus, il faut choisir d'exprimer cette activité par rapport au poids frais ou par rapport au poids sec. La plupart des auteurs ont préféré le poids frais qui semble mieux caractériser le tissu vivant. Pourtant, certains tissus sont chargés de graisses qui sont provisoirement exclues du métabolisme, et ni le poids frais, ni le poids sec ne permettent de traduire cette caractéristique. Il m'a semblé plus exact de calculer l'activité dia tasiqne en fonction de la quantité d'azote présente dans le tissu au moment de l'expérience. •

Le dosage de l'azote s'effectue au microkjeldahl : la substance, pesée, est placée dans un matras avec 1 cm³ So_4H_2 pur et quelques grains d'un catalyseur minéral. J'ai employé celui de GUILLEMET et SHELL, qui comporte : 1 partie de So_4Cu , 10 de So_4K_2 , 1 de Hg0. On minéralise au bain de sable. On verse ensuite quelques gouttes de phthaléine du phénol dans le liquide, on le place dans le matras à réaction. On sature par de la soude à 40 %. L'azote du tissu, qui a formé avec So_4H_2 du sulfate d'ammonium, est alors libéré sous forme de NH_3 , pendant que l'acide sulfurique est neutralisé par la soude. L'ammoniaque se dégage. On l'entraîne par un courant de vapeur d'eau et on le recueille dans un peu d'eau en présence d'un indicateur spécial (mélange de rouge de méthyle et de bleu de méthylène) qui vire du violet au vert en solution alcaline. On titre l'ammoniaque par de l'acide sulfurique $\frac{\text{N}}{100}$; 1 cm³ So_4H_2 $\frac{\text{N}}{100}$ neutralise : 0,14 mg d'azote.

Pour être précis, de tels dosages doivent être effectués 3 ou 4 fois sur le même tissu, ou porter sur une quantité de matière suffisante : 50 mg, par exemple. Or, fréquemment, les fragments de tissu dont je disposai, pour doser d'une part l'anhydrase - carbonique, d'autre part l'azote, ne pesaient pas 50 mg. Je n'ai donc pu faire qu'un dosage sur de tels fragments (par exemple sur le poumon d'*Helix aspersa*). Les résultats dans ce cas sont plus incertains, ils ont surtout une valeur d'indication. Les dosages ont toujours été faits sur les tissus frais, car il résulte du tableau VII (p. 54), qu'il n'y a pas d'avantage particulier à ramener les résultats au poids sec.

Les tissus examinés étaient des poumons d'*Helix aspersa*.

Pour faire un dosage de diastase on utilise un fragment de tissu, de poids frais = P mg. L'azote est dosé sur un autre fragment de poids p. On calcule donc l'azote contenu dans P mg de tissu. Mais comme les poids P varient d'un échantillon à l'autre,

TABLEAU VII

N ^{os}	Poids frais (mg)	Poids sec (mg)	N dosé (mg)	N dosé (mg) par g/p. f.	N dosé (mg) g./p. s.
1.	24,5	6	0,718	29,3	119,6
2.	26	8,5	0,917	35,2	108
3.	32,5	9,5	0,838	25,8	88,2
4.	29,5	9,5	0,798	27	84
5.	31	11	0,892	29	81

la comparaison ne peut s'effectuer que par rapport à une valeur fixe de l'azote. J'ai choisi : 25 mg d'azote, chiffre assez voisin de ceux que l'on obtient par gramme de tissu frais sur les poumons d'*Helix aspersa*. Ce choix est arbitraire, mais il est impossible qu'il ne le soit pas. La comparaison des activités enzymatiques entre elles reste significative, et probablement davantage que si l'on revient à l'unité de poids frais.

Par conséquent, l'activité anhydrique d'un tissu sera représentée par la formule :

$$\frac{kd \times (\text{dilution})}{0,3364} \times \frac{25}{N/P. f.},$$

où : *dilution* = nombre de cm³ d'eau distillée dans laquelle on a broyé le tissu examiné, dont le poids frais est P. f.; N/P. f. est la quantité d'azote dosée au microkjeldahl dans P. f. milligrammes de tissu (1).

Les fragments de tissu sur lesquels le dosage de l'anhydrase est effectué sont, après pesée, broyés dans un mortier en porcelaine avec du sable de Fontainebleau. Ce sable fin a été préalablement nettoyé à l'acide chlorhydrique concentré, puis à l'eau distillée. On ajoute 1 à 2 cm³ d'eau distillée au broyat et on filtre sur verre fritté n° 2. L'extrait aqueux est opalescent en général, et sa nature colloïdale ne permettrait pas qu'on le filtrât sur verre fritté n° 3 ou 4. J'avais essayé de centrifuger l'extrait aqueux avant de le filtrer. Mais on observe dans ces conditions des anomalies et je me suis contenté de filtrer. Je n'ai pas utilisé les extraits précipités, à l'alcool-chloroforme ou à l'alcool-éther que MELDRUM et ROUGHTON avaient préconisés. Il n'y a aucun avantage à le faire.

On appréciera la sensibilité de la méthode que j'emploie en la comparant à celle de MAETZ (*loc. cit.*) qui utilisait la boat-method de M. et R., avec un manomètre de BARCROFT : cet auteur broyait par exemple : 1 g de poumon d'*Helix aspersa* dans 10 cm³ d'eau. J'opère, avec le même tissu, sur des quantités qui peuvent être de 17 mg (exp. du 23 mai 1949) dilués dans 2 cm³ d'eau distillée.

En solution homogène, en présence d'eau distillée, on obtenait des valeurs de *k*₀ parfois très différentes d'une expérience à l'autre. Il en est de même, à plus forte raison, si l'on opère avec des extraits de tissu, puisque le filtrat est colloïdal; chaque prise de 0,58 cm³ contient un certain nombre de particules dont les tailles sont très variables; la catalyse, dans ces conditions, n'est pas une catalyse en milieu homogène. Il est donc

(1) Il n'est pas certain que tout l'azote présent dans les tissus soit libéré par le dosage au microkjeldahl. Mais il ne s'agit pas ici d'évaluer des activités « absolues », seulement de faire des comparaisons dans des conditions expérimentales aussi rigoureuses que possible.

indispensable, avant de prélever 0,58 cm³ d'extrait aqueux, d'homogénéiser le liquide en l'agitant convenablement. D'autre part, *kc* sera comparable à *ko moyen* s'il est obtenu dans des conditions analogues, c'est-à-dire si l'on a un *kc moyen*. Il serait souhaitable que l'on pût réaliser un grand nombre d'expériences avec chaque extrait de tissu. Mais on ne dispose généralement que de deux, trois, au grand maximum 4 cm³ de filtrat; il en résulte qu'il n'est pas possible d'avoir plus de 4 valeurs de *kc* dans la plupart des cas.

Toutes les activités qui sont chiffrées dans cet ouvrage ont été obtenues en prenant la moyenne de 2 *kc* au moins. Quand il n'a pas été possible d'avoir les 1,5 cm³ de liquide nécessaires pour obtenir ce résultat, je l'indique expressément; car (*kc-ko*) n'a plus alors qu'une valeur d'indication.

D'autre part, j'ai utilisé les valeurs des *kc* situées entre $ko + \sigma$ et $ko + 2 \sigma$, ne considérant comme dépourvus de diastase que les extraits ou les liquides dont les *kc* étaient inférieurs à $ko + \sigma$.

CHAPITRE II. — L'INTERVENTION DE L'ANHYDRASE-CARBONIQUE DANS LA FORMATION DE LA COQUILLE DES MOLLUSQUES EST POSSIBLE

A. — Action d'un inhibiteur de l'anhydrase, le benzène-sulfamide, sur la régénération des coquilles d'*Helix*.

Nous avons vu que BENESCH et ses collaborateurs ont montré que l'on pouvait inhiber la calcification chez les Vertébrés à l'aide de certains sulfamides. Cette inhibition n'était certes pas spécifique de l'anhydrase-carbonique, puisque, selon les auteurs eux-mêmes, la phosphatase alcaline, sans laquelle l'ossification ne se ferait pas, est inhibée.

Je songeai, avant d'effectuer des dosages d'anhydrase sur les tissus qui m'intéressaient, à appliquer la même recherche que BENESCH aux Mollusques. Aussi bien cela n'avait-il pas été fait sur les Invertébrés. Mais je savais d'avance qu'un résultat positif n'aurait pas démontré absolument l'intervention de l'anhydrase.

Le benzène-sulfamide, le plus simple des sulfamides, se présente sous forme de lamelles cristallines difficilement solubles à froid, plus solubles si elles sont finement broyées. On emploie en général le dérivé sodé; mais, pour ne pas risquer d'introduire dans les solutions des traces de produits étrangers, je l'ai d'abord utilisé pur. Il se dissout un peu mieux dans l'eau tiède et, à raison de 6 à 8 mg par cm³, on peut appliquer la solution sur les tissus sans qu'elle recristallise.

Je découpai des ouvertures rectangulaires, analogues à celles que j'ai décrites (Cf. I^{re} partie) sur le dernier tour de la coquille d'*Helix aspersa* (Müll), et déposai sur le manteau, par les fenêtres ainsi ouvertes, une goutte de la solution inhibitrice toutes les demi-heures, pour entretenir l'humidité. Les témoins étaient traités à l'eau distillée dans les mêmes conditions. Normalement, les animaux opérés ferment les ouvertures en régé-

rant une membrane calcifiée; ce phénomène se réalise en l'espace de 3 ou 4 heures. La matière organique se dépose la première, puis les cristaux apparaissent (MOYNIER DE VILLEPOIX, LEVETZOW, MANIGAULT [*loc. cit.*]).

En examinant d'heure en heure les régénérats des témoins et des sujets traités, on arrive à saisir des différences très nettes : les cristaux sont moins nombreux, plus espacés dans la dernière catégorie; mais on sait que les *Helix* présentent des différences individuelles considérables au point de vue physiologique, et telles qu'il est illusoire de comparer des *Helix* entre eux, à quelque sujet que ce soit, même s'ils proviennent d'un seul élevage. P. MEYER et M. A. THIBAUDET l'ont montré au cours de leurs recherches sur l'hibernation et l'estivation des Hélices (*C. R. Soc. Biol. Lyon*, CXXIV, 1937). C'est pourquoi je ne pouvais tirer de conclusion valable que si les observations portaient sur un nombre suffisant d'exemplaires. Cela était d'autant plus indispensable qu'il y a des causes d'erreur assez fortes de ce genre d'expériences : en effet, il arrive que le manteau bombe vers l'extérieur au contact de la première goutte, puis retombe en se creusant légèrement, ce qui répand une partie du liquide hors de l'ouverture; le benzène-sulfamide n'est qu'un inhibiteur partiel de l'anhydrase; de plus, s'il est absorbé par la membrane mince que constitue le poumon de l'*Helix*, il doit être assez rapidement éliminé. Son action s'exerce donc probablement sur les diastases libérées par l'animal en même temps que le complexe pré-calcaire. Si cette action est positive, on doit observer une décalcification globale du régénérat; des expériences d'inhibition que j'ai réalisées sur d'autres matériels : *Coleps hirtus* (Nitzsch) [181] et *Paracentrotus lividus* [223], à l'aide du dérivé sodé, montrent bien que les dépôts minéraux sont seuls inhibés; la matière organique se dépose quand même. Mais, chez *Helix*, ce dépôt peut être si faible, 3 ou 4 heures après l'ouverture, qu'on ne peut enlever avec une pince la fragile membrane qui s'est formée, ce qu'il est par contre facile de réaliser sur les témoins qui sont déjà calcifiés. On dispose ainsi d'un moyen de comparaison facile.

J'ai opéré sur des séries de 6 à 10 animaux; le benzène-sulfamide était dissous dans l'eau, ou dans la solution à 4 cations recommandée par HÉLÈNE BLANC [51] pour les Escargots. Cette solution est à base d'eau d'Evian; elle est tamponnée au pH : 7,35; son Δ est de 0,55 en présence des 4 cations suivants : NaCl, 1,06 g ‰; KCl, 0,17 g ‰; $MgCl_2$, 0,3 g ‰; $CaCl_2$, 0,3 g ‰.

Les animaux la supportent parfaitement bien. Après le traitement, on constate : soit que la membrane, moins épaisse que chez le témoin existe, soit qu'il n'y en a qu'un fragment qu'on peut saisir, soit qu'elle est tellement mince qu'il est impossible de la saisir. Dans le premier cas, l'inhibition n'a pas eu lieu; dans le second, le résultat est douteux; dans le troisième, il est positif.

Sur 120 sujets traités avec autant de témoins, on relève les résultats suivants : 60 % des animaux n'ont pas régénéré, 20 % sont douteux, 20 % ont régénéré.

Il est donc permis d'affirmer que le benzène-sulfamide inhibe partiellement la calcification chez *Helix aspersa*.

Ces expériences ont été réalisées, par principe, sur des animaux de poids comparables, soit au printemps, soit au début de l'été, en période, par conséquent de pleine activité. Elles prouvent simplement que la calcification des Mollusques est déterminée par des diastases qui sont : la phosphatase alcaline certainement; l'anhydrase-carbonique peut-être; il n'y a rien d'original dans cette constatation. J'entrepris alors d'étudier les

variations de l'activité anhydrique en fonction de la saison; je choisis, pour réaliser ces expériences, *Helix aspersa* (Müller). Ce Mollusque, qui avait déjà servi à MANIGAULT pour ses dosages de phosphatase, était le seul qu'il soit possible de se procurer à Paris en toutes saisons.

B. — Variations de la teneur anhydrique du manteau d'Helix aspersa (Müll.),
en fonction de la saison.

Les dosages ont été effectués sur 3 parties différentes du manteau : le poumon, la bandelette palléale et le bourrelet antérieur du manteau.

Le poumon, que l'on appelle encore le « toit du manteau », est une membrane mince, comportant à sa partie supérieure une couche de cellules épithéliales et sous celles-ci du tissu conjonctif où l'on trouve des lacunes, des fibrilles. Le poumon est parcouru par la veine pulmonaire dont on voit les nombreuses ramifications à la face interne. Les cellules épithéliales interviennent dans la sécrétion de la nacre (MOYNIER DE VILLEPOIS [*loc. cit.*]). MANIGAULT a montré d'ailleurs que les lacunes sanguines se gonflent sous un afflux de liquide au moment de cette croissance.

La bandelette palléale est un tissu complexe, comme nous l'avons vu. Elle est pourvue d'un sillon palléal dont une des lèvres sécrète le *periostracum*, l'autre la couche des prismes de la coquille. Il n'est évidemment pas possible de séparer ces deux parties. On coupe le tissu à l'endroit où le poumon rejoint les muscles qui doublent la bandelette palléale et le bourrelet antérieur du manteau (fig. 1, E).

Le bourrelet antérieur du manteau est cette partie blanchâtre que l'on aperçoit à l'ouverture de la coquille quand l'animal est étalé. On y distingue une ouverture, le pneumostome, qui est l'orifice respiratoire. On trouve dans ce tissu : d'une part, des glandes calcaires que PRENANT (*loc. cit.*) a bien étudiées; d'autre part, des glandes à mucus, dans un autre territoire, sans compter bien entendu les éléments ordinaires (fig. 1, E).

Il est évident que les dosages d'anhydrase-carbonique sur de tels tissus ne peuvent avoir qu'une signification grossière. Si l'enzyme intervient dans la sécrétion du calcaire, c'est qu'il est localisé dans les cellules épithéliales du manteau (poumon), comme l'est la phosphatase alcaline. Mais on ne dispose pas d'une technique histochimique pour le montrer. Quant au dosage biochimique que j'effectue, il porte sur un ensemble d'éléments dont la plupart sont étrangers à la couche de cellules qui m'intéressent, et par conséquent les résultats sont *a priori* difficiles à interpréter, car les éléments autres que les cellules épithéliales peuvent aussi contenir de l'anhydrase. Les résultats que l'on obtient avec le poumon sont cependant plus significatifs que les deux autres : en effet, on opère toujours dans les mêmes conditions, sur des membranes comparables, tandis que les prélèvements de bandelette palléale ou de bourrelet antérieur contiennent plus ou moins du muscle sous-jacent. Le bourrelet antérieur ne participe pas à la formation de la coquille : il forme l'épiphragme de l'Escargot et le processus de cette formation n'est pas comparable, selon PRENANT, à celui de la coquille, car il ne se réalise pas par dissociation d'un bicarbonate. J'ai cependant recherché l'anhydrase-carbonique dans ce tissu à titre d'indication, mais il est bien entendu que je n'en ai tiré aucune conséquence relative à la forme

minéralogique du calcaire qui se dépose sur l'épiphragme et qui est toujours de la calcite.

Il apparut dès les premières expériences que la teneur anhydrasique d'un tissu n'est pas fixe; d'un individu à l'autre, on observe des variations importantes. FLORKIN (cité par MAETZ) et d'autres auteurs l'avaient déjà remarqué. C'est pourquoi il était nécessaire,

TABLEAU VIII

VARIATIONS DE L'ACTIVITÉ ANHYDRASIQUE DU MANTEAU D'*HELI*X ASPERSA EN FONCTION DES SAISONS

Tissu		Saison								
		Printemps		Été		Automne		Hiver		
		Activité en U)								
		Moyenne	Moyenne générale	Moyenne	Moyenne générale	Moyenne	Moyenne générale	Moyenne	Moyenne générale	
		Nombre d'exemplaires traités.								
		10		1 ^o : 6, 2 ^o : 6		10		6		
<i>Poumon</i>	{	b.	3,065	2,726	1 ^o 1,886 2 ^o 2,084	1 ^o 1,990	1,175	0,337	0,932	
		n. b.	2,387		1 ^o 2,094 2 ^o 1,626	2 ^o 1,885		1,528		
		Nombre d'exemplaires traités.								
		10		6		10		6		
<i>Bandelette palléale</i>	{	b.	0,543	0,634	0,354	0,290	0,175	0,314	0,322	0,351
		n. b.	0,725		0,227		0,453		0,381	
		Nombre d'exemplaires traités.								
		10		6		10		6		
<i>Bl antérieur du manteau</i>	{	b.	0,464	0,439	0,217	0,142	0,043	0,227	0,215	
		n. b.	0,415		0,068			0,204		

(b. : animaux bordés. — n. b. : animaux non bordés.)

en chaque saison, de faire plusieurs dosages sur chaque type de tissu et d'en prendre la moyenne. Il fallait aussi distinguer les Escargots jeunes et les adultes : les premiers ont une coquille qui n'est pas bordée, contrairement aux seconds. Mais comme la croissance en épaisseur de la coquille se manifeste par la formation de la nacre et qu'elle dure toute la vie de l'animal, on ne pouvait s'attendre à trouver des différences entre les jeunes et les adultes, en ce qui concerne l'activité anhydrasique du poumon. Cela ressort d'ailleurs nettement du tableau VIII.

Il pouvait ne pas en être de même dans l'étude de la bandelette palléale, les cellules sécrétrices du sillon palléal reprenant leur activité au printemps chez les jeunes, quand la coquille s'accroît. Malheureusement les causes d'erreur que j'ai énumérées sont trop importantes pour que l'on puisse déceler une différence d'activité enzymatique nette entre les jeunes et les adultes, et si l'activité moyenne est plus élevée dans la bandelette palléale des Escargots non bordés au printemps, en été, c'est la moyenne des Escargots bordés qui est la plus forte.

Enfin, la nécessité dans laquelle je me trouvais d'effectuer les dosages en un laps de temps aussi court que possible, pour ne pas empiéter sur la saison suivante, ne m'a pas permis de faire, suivant les cas, plus de 6 à 10 mesures par catégorie. Il eût été évidemment souhaitable d'avoir un nombre beaucoup plus grand de résultats, mais les moyennes du tableau VIII n'en représentent pas moins une précieuse indication d'ensemble.

Remarques : 1° Les activités sont exprimées en unités selon la formule précédemment établie; 2° Pour chaque tissu, en chaque saison, le nombre d'exemplaires traités comporte la moitié de bordés et la moitié de non bordés, sauf en automne, pour le poumon et le bourrelet antérieur du manteau. 3° J'ai eu l'occasion, en été, de faire deux séries de dosages, au nombre de 6 chacune, sur les poumons d'*Helix* : en juillet et en septembre.

Le tableau détaillé de ces dosages est placé à la fin de ce chapitre (Cf. tableaux et notes annexes; n° 13). Les activités qui sont notées en regard de chaque tissu représentent, bien entendu, la moyenne des activités obtenues sur chacun des extraits, après 2, 3 ou 4 mesures de kc.

Les Escargots dont je me suis servi au cours de ces expériences ont été achetés, toute l'année, chez le même marchand; ils provenaient toujours de la même région. J'ai déjà indiqué d'ailleurs que les *Helix* avaient rarement des réactions physiologiques en tous points semblables. Mais en procédant comme je l'ai fait, je possédais des lots d'animaux de poids comparables; ce n'était pas une garantie, mais une précaution. Les dosages d'hiver ont été effectués vers la fin de janvier et le début de février. J'avais placé, en vue de ce travail, un lot d'Escargots au frigidaire, 3 mois auparavant. J'ai opéré sur les survivants bien entendu; les dosages de printemps ont été faits vers la fin du mois de mai, sur des animaux bien réveillés, bien nourris, et qui manifestaient une grande activité. Les dosages d'été ont été réalisés, soit dans la deuxième quinzaine du mois de juillet pour la série n° 1 du poumon, soit dans la deuxième quinzaine du mois de septembre, au cours d'une année où l'été s'était prolongé, pour la série n° 2 du poumon et les autres tissus. Enfin les séries d'automne ont été effectuées durant le mois de novembre.

Si l'on représente chaque résultat par un point sur un graphique où les activités sont placées en ordonnée et les mois en abscisse, on obtient les courbes de la figure 26. La ligne en pointillé qui relie les moyennes générales (en italique dans le tableau VIII, et représentées par un cercle sur le graphique), montre incontestablement l'existence d'un *maximum d'activité au printemps* dans les 3 fragments du manteau examinés.

On remarque aussi que le poumon possède une activité anhydrasique constamment supérieure aux autres parties du manteau, la bandelette palléale étant d'autre part plus active que le bourrelet antérieur.

J'ai fait les mêmes dosages sur *Helix pomatia* (L.), au printemps. En voici les résultats (Cf. tableau VIII bis).

Ces valeurs sont tout à fait comparables à celles d'*Helix aspersa* à la même saison, sauf en ce qui concerne le bourrelet antérieur dont la teneur en diastase est considérable, ce dont je ne saurais tirer aucune conséquence. On peut admettre, par contre, pour l'ensemble des résultats, que l'activité de l'anhydrase-carbonique augmente au prin-



FIG. 26. — L'unité est représentée : en ordonnée, par 0,5 cm; en abscisse, par 0,75 cm.

temps dans le manteau; et puisque la coquille s'accroît au printemps, alors que l'anhydrase semble participer au renouveau d'activité des fonctions de l'Escargot au même moment, nous sommes en droit de considérer comme possible l'intervention de cet enzyme dans les phénomènes qui aboutissent à la formation de la coquille.

TABLEAU VIII bis

(pour les résultats détaillés, Cf. tableau XIII bis).

Poumon	Non bordés Bordés	3,584 U. 1,878 U.	Moy. gén. : 2,731 U. (6 exempl.).
Bte palléale	Non bordés Bordés	0,709 U. 0,482 U.	Moy. gén. : 0,595 U (6 exempl.).
Bt antérieur	Non bordés Bordés	1,086 U. 1,233 U.	Moy. gén. : 1,159 U. (6 exempl.).

CHAPITRE III. — L'ANHYDRASE-CARBONIQUE INTERVIENT DANS LE DÉTERMINISME DES FORMES MINÉRALOGIQUES DU CALCAIRE

On ne pouvait conclure de l'intervention, « possible », de l'anhydrase-carbonique dans la formation des coquilles, à son rôle dans la cristallisation du calcaire sous forme d'aragonite. Il restait à étudier la distribution de l'enzyme dans le manteau et le bourrelet palléal des Mollusques; on pouvait espérer tirer de cette étude quelques éclaircissements sur le rôle exact de l'anhydrase. Si l'anhydrase-carbonique était le facteur déterminant de la formation de l'aragonite, on devait s'attendre, en effet, à trouver des différences d'activité très nettes entre les tissus qui forment de l'aragonite et ceux qui forment de la calcite; ces derniers ne devant posséder que peu ou pas de diastase, puisque les dépôts de calcaire devraient tous, en principe, être faits de calcite.

A. — Distribution de l'anhydrase-carbonique dans le manteau des Mollusques à coquilles calcitique et aragonitique.

Les dosages ont été effectués de préférence sur des animaux dont je connaissais la structure de la coquille pour l'avoir étudiée aux rayons X. Les résultats en sont exposés à la fin de ce chapitre, dans le tableau XIV.

Il suffit de consulter la liste des activités pour constater une fois de plus qu'il n'y a aucune homogénéité dans la répartition de l'anhydrase-carbonique. Même d'un individu à un autre, sur le même tissu, on trouve des différences considérables qui peuvent aller de l'absence apparente de diastase à une activité importante. Sur l'*Unio* (species) n° 4, on ne peut relever aucune trace d'enzyme dans le manteau de la valve gauche; mais, dans celui de la valve droite du n° 2, on trouve 18,165 unités d'anhydrase, ce qui constitue un maximum que je n'ai jamais retrouvé dans un autre manteau.

De plus, j'ai eu l'occasion d'observer un phénomène curieux, inattendu, qui se produit seulement avec les extraits de certains tissus, ou avec des tissus d'animaux qu'on a placés dans des conditions anormales :

J'ai expliqué précédemment que le liquide manométrique descend au début d'une expérience, dans la branche de droite du manomètre (Cf. fig. 18), puis remonte légèrement au delà de son point de départ jusqu'au moment où le gaz dégagé dans le mélangeur le repousse. Cela se produit en solution homogène, dans les conditions ordinaires. Si l'extrait ou le liquide étudié contient une assez grande quantité de diastase, le liquide manométrique descend brusquement quand le bicarbonate tombe dans le phosphate, mais il ne remonte pas : pendant un temps variable de 2 à 4 secondes, il reste au même niveau; l'aspiration produite par la diminution de volume du gaz refroidi dans le mélangeur est compensée par le CO_2 dégagé dès le premier contact entre le bicarbonate et le phosphate en présence de la diastase. Ensuite la réaction se déclenche rapidement.

Quand il n'y a pas d'anhydrase dans le liquide utilisé, il se dégage une quantité

de CO_2 telle que sa pression dans le manomètre corresponde à des valeurs comprises entre 145 mm et 160 à 170 mm, après 12 intervalles de 15 s., suivant le point de départ qui peut varier de 0 à 20 au maximum. Les constantes de vitesse s'expriment par k_0 . Mais avec les extraits de tissu dont je viens de parler, on constate, dès la mise en marche de l'appareil, que le liquide manométrique de la branche de droite, s'il descend d'abord normalement, remonte ensuite de manière exagérée. Puis la réaction se produit, mais très lentement. Il faut attendre dans certains cas plusieurs minutes avant que le liquide de Brodie ne revienne au zéro. On note alors les pressions et on s'aperçoit que les valeurs les plus élevées varient de 110 à 125 après 12 intervalles, parfois même 14 intervalles de 15 s. La réaction semble « étriquée » par rapport aux autres. Les constantes de vitesse sont parfois plus basses que le k_0 moyen aux températures de l'expérience, mais aussi fréquemment elles restent au voisinage du k_0 moyen. De toutes façons elles ne sortent qu'assez rarement des zones de variation que j'ai décrites.

On observe régulièrement ce phénomène avec les extraits du manteau et du bourrelet palléal d'*Arca Noe* (L.), avec le manteau et le bourrelet palléal de certains exemplaires de *Dosinia exoleta* (L.), avec le bourrelet palléal de *Pecten maximus* (L.), avec le bourrelet palléal des *Unios* et le manteau de certains individus de ce genre; je l'ai observé aussi en juillet 1949, sur les extraits de deux bandelettes palléales d'*Helix aspersa*. Ces animaux n'étaient pas bordés; ils étaient à jeun depuis longtemps et très peu vivaces; ils avaient supporté la chaleur torride de cette saison. Enfin on peut l'observer sur les manteaux de divers Lamellibranches, quand on les maintient à sec, au frigidaire, avant la mort.

Il arrive aussi que la constante de vitesse soit assez élevée, malgré la lenteur du dégagement de CO_2 , pour que l'on sorte de la zone : $k_0 + 2\sigma$, et que l'on puisse affirmer qu'il existe de l'anhydrase dans le tissu; par exemple, le manteau de la valve gauche d'*Unio pictorum* n° 1 donne : $k_c = 0,0092$ et une activité diastasique que l'on peut chiffrer par : 0,549 unité; les repères de pression, pour ce tissu et pour les n° 3 et 4, s'échelonnent de 5 à 111, 5 à 123.

Ainsi, certaines substances provenant des extraits de tissu diminuent le rendement en CO_2 , sans ralentir la constante de vitesse de la réaction. Cette propriété est mise clairement en évidence dans l'expérience suivante, au cours de laquelle on modifie la prise d'essai en lui incorporant de l'anhydrase-carbonique préparée par ailleurs.

On prend 0,5 cm³ d'une solution A, riche en diastase (préparée en dissolvant de l'A. C. en poudre dans de l'eau distillée) et on l'étend à 2 cm³ avec de l'eau. On obtient ainsi une solution B qui nous servira de témoin.

Pour B : $k_c = 0,0182$ et $0,0170 (< 1^\circ)$: $k_d \text{ moyen} = 0,0116$.

Pour une solution C, préparée en ajustant les 0,5 cm³ de la solution A à 2 cm³ avec l'extrait aqueux du bourrelet palléal d'*Arca Noe* (1 cm³ d'extrait + 0,5 cm³ H₂O) : $k_c = 0,0178$; $0,0192$; $0,0182. (< 1^\circ)$: $k_d \text{ moyen} = 0,0124$.

Les constantes de vitesse sont parfaitement comparables. Et pourtant ! Le témoin, avec la solution B, plafonne à 222-225 mm en 7 à 9 intervalles de 15 s., tandis qu'avec la solution C, on atteint 210-216 après 12 intervalles de 15 s. La réaction donne, sans contestation possible, l'impression d'être plus lente. Les expériences au cours desquelles ces anomalies se sont produites sont marquées dans le tableau par un astérisque (*).

Mais comment peut-on interpréter le phénomène ? Faut-il admettre, quand la constante de vitesse est voisine de k_0 , qu'il n'y a pas de diastase dans l'extrait de tissu ?

On pourrait penser que cet extrait a la propriété d'absorber physiquement ou chimiquement le CO_2 et que ce gaz ne se dégagerait dans le manomètre qu'après avoir saturé la solution (1). Mais on peut aussi envisager que la diastase existe dans le tissu broyé, et qu'elle est influencée par des effecteurs dont nous ne connaissons pas la nature, ce qui l'amènerait à fonctionner dans le sens de la synthèse au lieu d'agir dans le sens de la déshydratation. Autrement dit, certains tissus posséderaient des activateurs de synthèse; cela permettrait d'expliquer pourquoi ces extraits, mélangés à de l'anhydrase-carbonique proprement dite, diminueraient le dégagement de CO_2 sans rien changer à la constante de vitesse mesurée, puisque la mesure ne s'effectuerait en réalité que sur le CO_2 dégagé après saturation des 1,74 cm³ du liquide qui se trouve dans le mélangeur. Cette dernière interprétation a le mérite de se relier à ce que l'on connaît des diastases en général et de la complexité des actions qui peuvent orienter leur intervention dans un sens ou dans l'autre. Il est possible aussi qu'il existe deux formes (ou plus) d'anhydrase-carbonique qui agiraient différemment; et si ces deux formes sont présentes simultanément dans un même tissu, en quantités équivalentes ou non, on conçoit qu'il puisse se produire des irrégularités au cours de la réaction.

Je ne choisirai pas pour l'instant entre ces diverses interprétations, qui sont peut-être d'ailleurs toutes valables. Je remarquerai seulement que les extraits de manteau étudiés comportent une très faible proportion de cellules sécrétrices et parfois une masse relativement considérable de chair. Mais quand on peut détecter sur le même tissu, par exemple sur le manteau de l'*Unio* n° 2, une activité diastasique certaine dans un cas, et se trouver dans un autre cas en présence des difficultés dont il vient d'être discuté (*Unios* n° 3-4), il est permis de dire qu'il peut exister de l'anhydrase-carbonique dans le tissu considéré.

Ces commentaires constituent l'essentiel des réflexions qu'il convient de faire en lisant le tableau XIV. Il ne reste plus que quelques détails à signaler. A titre de comparaison il m'est arrivé d'étudier la branchie des Lamellibranches en même temps que le manteau; parfois je ne disposai pas d'une quantité de matière suffisante pour faire à la fois un dosage d'azote et une mesure de l'activité diastasique. Je me suis contenté alors de donner la valeur de k_c . Comparée à k_o , cette valeur permet de dire qu'il y a ou qu'il n'y a pas d'anhydrase dans le tissu examiné.

Quand il n'y a pas assez de matière sur un seul échantillon pour faire seulement une mesure de k_c , on prend la moyenne de plusieurs prélèvements. C'est ce que j'ai été obligé de faire avec les téguments dorsaux qui enveloppent la masse viscérale de *Patella vulgata* (L.), et avec les manteaux des Gastéropodes côtiers, qui sont très petits. Le tableau indique alors le nombre d'exemplaires utilisés pour faire le dosage. Chez *Paludina vivipara* (Lmk.), j'ai opéré sur 4 exemplaires pesant chacun 2 g 5 environ (il s'agit de jeunes paludines; les adultes que j'avais à ma disposition (n° 1-2-3) incubaient; elles étaient remplies de petites paludines, ce qui ne permettait pas de considérer les mesures effectuées sur leur manteau comme significatives). J'ai pu obtenir ainsi 19 mg de matière. Comme cela ne suffisait pas pour faire en même temps un dosage d'azote,

(1) Ces phénomènes sont possibles : en effet, si l'on opère en solution homogène en prenant 0,58 cm³ d'un détergent comme la Sapamine M. S., qui a des propriétés un peu spéciales (Cf. J. POLONOWSKI : *Thèse Paris*, 1949) à la concentration de 1 ‰, on constate que la réaction est plus lente, que les plafonds sont plus bas qu'en présence d'eau distillée. Avec la Sapamine M. S. à 1 ‰, au-dessous de 1°, k_o est même plus bas qu'avec l'eau distillée : $k_o \text{ sap.} = 0,0048$. Cette valeur remonte, le rendement en CO_2 également, si l'on mélange de l'eau salée à la Sapamine : $k_o \text{ sap.} + \text{NaCl} = 0,0058$ entre 1° et 2°.

j'ai calculé l'activité anhydrasique en prenant pour N/P. f. la moyenne des valeurs trouvées sur les manteaux de quelques autres individus. Le nombre ainsi obtenu n'est évidemment fourni qu'à titre indicatif, mais la valeur élevée de k_c prouve qu'il y a de l'anhydrase dans le manteau des jeunes paludines. Enfin, les valeurs de k_d , pour *Mytilus edulis* (L.) sont exprimées en g de matière fraîche ou par rapport à 25 mg d'azote libérable au microkjeldahl, comme les autres mesures : le manteau des Moules était en effet chargé de matière grasse. On peut ainsi apprécier la différence des activités calculées par les deux procédés; pour le manteau de la Moule n° 1, on trouve 0,315 U/25 mg N et 0,141 U/g de poids frais. L'écart est moins considérable dans le bourrelet palléal qui est moins gras : 0,661 U/25 mg. N et 0,585 U/g de poids frais.

Si l'on sépare les Mollusques à coquille totalement ou partiellement calcitique des autres, on remarque que seules : *Ostrea edulis* (L.) et *Anomya ephippium* (L.) sont dépourvues d'anhydrase aussi bien en ce qui concerne leur manteau qu'en ce qui concerne leur bourrelet palléal. Le cas du *Pecten* est un peu différent : le manteau de ce Lamellibranche comporte une partie mince, transparente, insérée sur la coquille, et une bordure large, charnue, formée de deux parties : la première est placée au contact de la coquille, la seconde orientée vers l'intérieur et garnie de prolongements filiformes. La membrane mince n'a pas de diastase. Quant aux deux parties de la bordure, leurs extraits donnent les anomalies que j'ai déjà signalées, avec des k_c tels, qu'il faut admettre, en principe, qu'il n'y a pas d'anhydrase : $k_d = 0$. Les prévisions que j'avais faites semblaient donc se justifier par ces 3 exemples. Mais il n'en était pas de même pour les autres espèces. *Patella vulgata*, *Gryphea angulata* sont riches en diastase. Le bourrelet palléal de *Mytilus edulis* a plus d'anhydrase que le manteau, alors que l'on pouvait s'attendre à l'inverse. Le manteau, aussi bien que le bourrelet palléal de *Littorina littorea* (L.) et de *Purpura lapillus* (L.), sont très riches en diastase.

Fallait-il renoncer à considérer l'anhydrase-carbonique comme le facteur décisif dont l'intervention devait déterminer la formation de l'aragonite ? Il était pourtant troublant de constater que les seuls manteaux complètement dépourvus de diastase, parmi ceux que j'avais examinés, appartenaient à des Mollusques dont la coquille est calcitique. Si l'hypothèse de départ était exacte malgré tout, il fallait admettre que la diastase, dans les manteaux qui donnent naissance à de la calcite, ne pouvait pas fonctionner. Cette réflexion me conduisit à comparer entre eux : *Gryphea angulata* et *Mytilus edulis* d'abord. En effet, la coquille de l'huître portugaise est entièrement calcitique, tandis que celle de la Moule possède une couche des prismes en calcite et une couche de nacre en aragonite. Or, chez la Moule, le manteau est *inséré* sur la coquille; on voit facilement la trace de cette insertion, qui sépare à la face inférieure de chaque valve la zone nacréée blanchâtre et légèrement bleutée, aragonitique, de la zone bleu foncé, calcitique (fig. 1, C). Chez l'huître portugaise, le manteau, par contre, semble libre dans le milieu (fig. 1, D).

Par conséquent, le manteau de l'huître portugaise et le bourrelet palléal de la Moule sont, du moins en première approximation, placés dans des conditions semblables : ils peuvent être baignés par l'eau de mer. Cette disposition entraîne nécessairement, si l'hypothèse de départ est exacte, que l'anhydrase-carbonique soit inhibée par l'eau de mer.

Mais, avant d'entreprendre les expériences de contrôle, je songeai que si l'eau de mer inhibait l'anhydrase-carbonique, il ne devait pas en être de même pour l'eau douce, et par conséquent on ne devait pas trouver de coquilles calcitiques dans les eaux douces. Je par-

courus donc de nouveau la liste des coquilles calcitiques et aragonitiques, et ne trouvai pas de coquille calcitique d'eau douce. Certes, LEVETZOW (*loc. cit.*) a signalé, d'après BOGGILD, que les *Neritina* (Lmk.), Gastropodes d'eau douce, ont une « toute mince couche de calcite ». Ce serait le seul exemple connu; encore serait-il souhaitable de vérifier cette affirmation aux rayons X, ce que je n'ai pas eu l'occasion de faire. Mais, laissant provisoirement de côté cette exception non contrôlée, je puis constater, avec BOGGILD lui-même d'ailleurs (*loc. cit.*), que *la plupart des coquilles calcitiques sont marines*. Parmi les formations terrestres, il existe des granules calcaires calcitiques, sous le manteau de certaines Limaces; seulement, comme LEVETZOW le fait remarquer, il s'agit là d'un cas un peu spécial.

B. — L'influence du milieu sur l'anhydrase-carbonique et la formation minéralogique du calcaire des coquilles.

1. — INHIBITION DE L'ANHYDRASE-CARBONIQUE PAR L'EAU DE MER

a) LES DONNÉES EXPÉRIMENTALES. — Les premiers essais pour connaître l'influence de l'eau de mer sur l'anhydrase-carbonique furent effectués avec de l'eau de mer qui provenait de réserves de laboratoire. Cette eau n'était évidemment pas d'une pureté parfaite, mais j'attendais de son utilisation une première indication. Je pris, comme source de diastase, du sang de Poule laqué (que MITCHELL et coll. avaient déjà utilisé).

Dans toutes les expériences qui vont suivre et qui sont destinées à mettre en évidence l'existence d'un inhibiteur ou d'un activateur de l'anhydrase-carbonique, la technique d'étude est toujours la même : on prend une quantité de $x \text{ cm}^3$ d'un liquide trop actif pour que l'on puisse y doser directement l'anhydrase. On le dilue à $x' \text{ cm}^3$, x' étant généralement 4 ou 5 fois plus élevé que x , d'une part avec de l'eau distillée, ce qui nous donne la solution témoin T; d'autre part avec le produit que l'on veut étudier, ce qui nous donne la solution P. On mesure les kd, fournis par T et P et l'on compare les valeurs ainsi obtenues.

Si l'on dilue le sang de Poule laqué avec de l'eau de mer en proportions variables : 24 %, 50 %, 72 %, 96 %, on observe des inhibitions qui s'échelonnent de 75 à 89 % de l'activité du témoin.

Mais il fallait opérer avec de l'eau de mer très pure. J'en trouvai à Paris, grâce à l'obligeance de la Pharmacie centrale des Hôpitaux. L'eau de mer dont je me suis servi a été prélevée au-dessus de fonds de 1 500 m, par 60°18' L. N., et 12°14' W. de Greenwich, à 4 ou 5 m de profondeur. En mélangeant cette eau à une solution diastasique (obtenue en dissolvant de l'anhydrase-carbonique en poudre dans de l'eau), de manière à avoir finalement 90 % d'eau de mer dans la solution P, on constate qu'il y a une inhibition de 73 % de l'activité anhydrique.

Mais on sait que le liquide retenu entre les valves des Mollusques, et notamment celui de l'Huitre, n'est pas absolument comparable à l'eau de mer. Selon BAYLAC (*in* RANSON : La vie des Huitres, Collection « Histoires Naturelles », N. R. F., 1943), on trouve dans ce liquide, avec l'eau de mer, des produits d'excrétion et de sécrétion : albumine : 2 g/l, de l'urée, des sels ammoniacaux, des phosphates, des sulfates, de la potasse, de

la silice. C'est dans ce liquide que baigne le manteau de la Gryphée. Je recommençai donc mes essais, d'une part sur le sang de Poule laqué, d'autre part sur de la diastase préparée, en remplaçant l'eau de mer par le liquide cavitaire des Huitres portugaises, et je constatai, suivant les conditions, que l'anhydrase-carbonique était inhibée dans des proportions qui variaient de 82 à 94,8 %.

Si l'on considère la constitution chimique d'une eau de mer moyenne, par exemple d'une eau de l'Atlantique, on trouve les chiffres suivants (d'après THOULET, *in* LEGENDRE : La concentration en ions hydrogène de l'eau de mer, le pH. P. U. F., 1925). Pour 1 000 g eau de mer :

	GR.		GR.
NaCl	27,3726	MgBr ²	0,0547
KCl	0,5921	Métaphosphate de Ca	0,0156
RbCl	0,0190	Bicarbonate de Ca	0,0625
SO ⁴ Ca	1,3229	Bicarbonate de Fe	0,0026
SO ⁴ Mg	2,2437	SiO ²	0,0149
MgCl ²	3,3625		
		Total	35,0631 g.

Par conséquent, l'eau de mer contient essentiellement des chlorures et des sulfates.

A quels sels de cette eau pouvait-on attribuer l'inhibition de la diastase ? J'ignorai, au moment où je fis ces expériences que ROUGHTON et BOOTH (*loc. cit.*) venaient de signaler que NH⁴Cl, KCl et NaCl étaient des inhibiteurs de l'anhydrase.

Mais, à présent que je puis confronter mes résultats avec ceux qu'ils ont publiés, je ne regrette pas d'avoir fait ce travail, car R. et B. n'avaient donné que deux valeurs numériques relatives à l'action du NaCl sur l'anhydrase et n'en n'avaient pas tiré de conséquences biologiques.

D'après R. et B. : 0,024 M. NaCl donnent au rapport :

$$\frac{\text{Activité dans le sel + phosphate}}{\text{Activité dans le phosphate}}, \text{ la valeur : } 0,69,$$

$$\text{et } 0,096 \text{ M. } \rightarrow 0,33.$$

Je constatai d'abord, au cours des recherches entreprises pour connaître les sels de l'eau de mer qui pouvaient inhiber la diastase, que tous les composés, sauf NaCl, à la concentration où ils existent dans cette eau, sont inefficaces. NaCl est le véritable inhibiteur de l'eau de mer. Son action se traduit d'autant plus nettement que sa concentration au sein de la solution est plus grande; l'inhibition tend cependant vers une limite. Cela ressort nettement du tableau IX et de la figure 27 qui en traduit graphiquement les résultats.

L'eau de mer, compte tenu des dilutions que l'on ne peut éviter de faire au cours des mesures, fournit, dans le mélangeur : 0,260 mM. de NaCl, ce qui provoque une inhibition de 80 %, en moyenne, de l'activité diastasique.

On remarquera que ces chiffres ne sont pas complètement comparables à ceux de ROUGHTON et BOOTH. Mais il n'en reste pas moins acquis que les solutions de NaCl ont un pouvoir inhibiteur marqué à partir d'une certaine concentration. Cette relation entre la concentration et le pouvoir inhibiteur de NaCl est un phénomène important. En effet, si l'eau de mer est diluée par de l'eau douce en quantité suffisante, elle agira plus faiblement sur l'anhydrase. Par conséquent, et en supposant provisoirement qu'il n'y a pas d'autres influences en jeu, on ne devrait pas trouver de coquilles calcitiques dans les eaux saumâtres peu salées, même si les dispositions anatomiques permettent à tout ou partie du manteau des Mollusques d'entrer au contact du milieu. Il semble bien qu'il en soit ainsi.

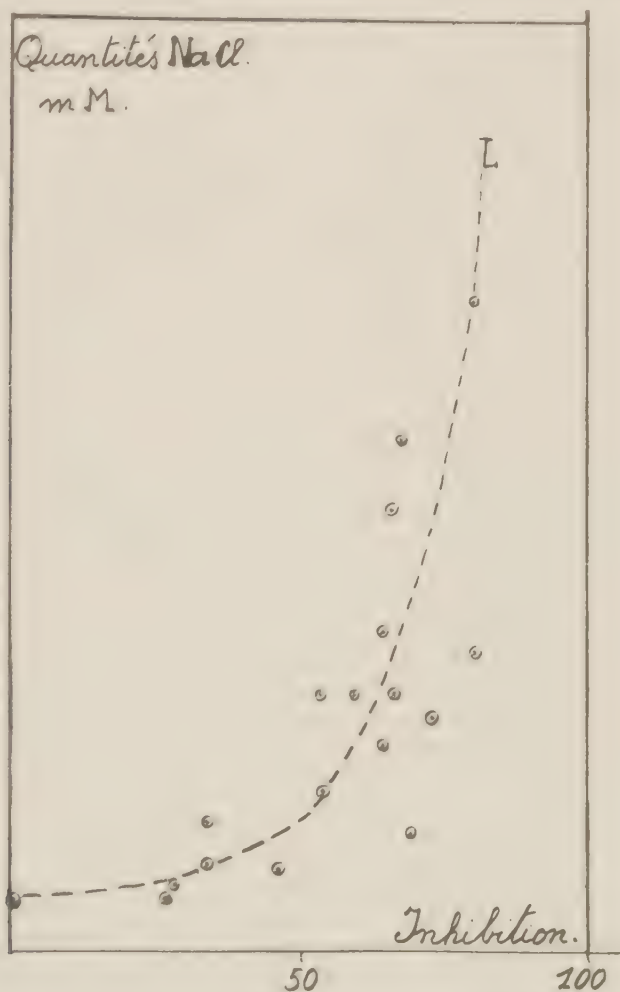
TABLEAU IX

INHIBITION DE L'ANHYDRASE-CARBONIQUE PAR LE CHLORURE DE SODIUM A DIVERSES CONCENTRATIONS

Quantité d'inhibiteur en mm.	Inhibition en %	Quantité d'inhibiteur en mm.	Inhibition en %
0,044	0	0,203	72,8
0,044	26,5	0,223	53
0,055	28	"	59
0,070	46	"	66
0,074	33,5	0,260	80
0,101	69	0,327	64
0,111	33,2	0,386	65,4
0,138	53,5	0,446	67
0,178	64	0,818	80

N.-B. — Etant donné les variations expérimentales possibles, l'inhibition qui n'est pas supérieure à 35-40 % n'est pas significative.

FIG. 27.
Variations
de l'inhibition
de l'anhydrase-carbonique
en fonction
de la teneur en NaCl
des solutions.
En ordonnée :
les mM.
En abscisse :
les % d'inhibition.



On constate d'autre part qu'il n'y a pas non plus de coquilles calcitiques chez les Mollusques marins fouisseurs. Il est donc possible d'envisager que la teneur en chlorure de

sodium libre des vases, des boues et des sables, dans lesquels vivent certains Mollusques, est moins forte que celle de l'eau de mer pure; bien qu'il n'y ait pas de documentation précise sur cette question, on ne saurait s'étonner d'un tel phénomène, car les vases, les boues et les sables sont riches en matière organique, qui peut adsorber les sels neutres [258]. L'anhydrase qui serait libérée par un manteau au sein de la vase ne serait donc pas forcément inhibée.

Je me suis demandé si le pouvoir inhibiteur du chlorure de sodium pouvait être attribué à l'un des deux ions : Na^+ ou Cl^- . Mais les mesures d'activité, en présence de 0,183 mM. de SO_4Na_2 , ne mettent pas en évidence la moindre inhibition, alors qu'une quantité voisine : 0,178 mM. de NaCl, fournit 64 % d'inhibition. De même, on n'observe aucune diminution de la constante de vitesse de la réaction témoin, si l'on opère avec 0,276 mM. de MgCl_2 . Par conséquent, il me semble difficile d'attribuer aux ions Cl^- , ou Na^+ , les propriétés inhibitrices que l'on remarque à ces concentrations avec NaCl. Le chlorure de sodium agirait donc par ses deux ions à la fois. Mais alors, tous les sels analogues, c'est-à-dire les chlorures alcalins, devraient être des inhibiteurs de l'anhydrase-carbonique ? En effet, j'ai obtenu les résultats suivants, en présence de quantités variables de chacun des produits.

TABLEAU X

Sel	Quantité utilisée : mM.	Inhibition en %
KCl	0,159	50
LiCl	0,278	61
NH_4Cl	0,243	47
RbCl	0,108	35

LiCl et RbCl sont donc à ajouter aux sels neutres inhibiteurs dont ROUGHTON et BOOTH ont fourni la liste. On sait d'autre part que les oxydants sont des inhibiteurs. NaI et NaBr se rangent dans cette catégorie. Je me suis donc demandé si l'on ne pouvait pas attribuer le pouvoir inhibiteur à tous les dérivés halogénés alcalins, et non plus seulement aux chlorures alcalins. L'action inhibitrice de NaI, NaBr, NaCl, étant désormais certaine, il restait à étudier les fluorures, l'un d'eux tout au moins. J'ai utilisé NaF; en présence de 0,620 mM. de NaF, 56 % de l'enzyme sont inhibés. Et si l'on veut ranger les dérivés halogénés alcalins par ordre de puissance inhibitrice, il suffit de comparer les valeurs ci-dessous pour se rendre compte qu'il faut employer des quantités de plus en plus grandes de produit, pour avoir des inhibitions de plus en plus faibles quand on passe du n° 1 au n° 4, et par conséquent ces inhibiteurs se classent de la manière suivante :



On retrouve là une série classique.

Il convient enfin de rappeler qu'il y a dans le sérum sanguin suffisamment de chlorure de sodium pour que l'anhydrase qui s'y trouverait libérée soit inhibée, indépendamment, bien entendu, de l'action de l'inhibiteur non dialysable que BOOTH (*loc. cit.*) a déjà décrit.

(1) Cette liste n'est donc pas exactement comparable à celle de ROUGHTON et BOOTH.

Si l'on fait agir NaCl sur des extraits aqueux de tissu aux concentrations qui s'étaient montrées efficaces précédemment, on ne constate plus l'inhibition observée à l'égard du sang laqué ou de l'enzyme préparé. J'ai expérimenté sur des extraits aqueux du manteau de *Gryphea angulata* et du poumon d'*Helix pomatia*. Il est à présumer que l'extrait de tissu contient des substances propres à paralyser l'effet inhibiteur du chlorure de sodium.

TABLEAU XI

N°	Composé	Quantité utilisée : mM.	Inhibition %
1.	NaI	0,078	100
		0,026	97
2.	NaBr	0,114	85
		0,038	53,5
3.	NaCl	0,101	69
		0,111	33,2
4.	NaF	0,620	56

J'ai essayé de trouver quelques anti-inhibiteurs du NaCl en mélangeant des protéines aux solutions. J'ai notamment travaillé avec une pseudoglobuline et une euglobuline, mais je ne puis affirmer positivement que l'inhibition par NaCl a été gênée dans ces conditions. Par contre, j'ai obtenu un résultat plus net avec un extrait aqueux du bourrelet palléal de *Pecten maximus*; cet extrait diminue un peu le taux d'inhibition par le chlorure de sodium de l'anhydrase-carbonique préparée. Il y a encore, évidemment, de nombreux essais à faire dans cette voie. Mais ce genre de recherche ne présentait plus qu'un intérêt documentaire, dont on ne pouvait espérer savoir si les protéines, auxquelles on peut attribuer « la protection » de la diastase, sont fixées ou non sur la molécule diastasique, ce qui constitue le problème important au point de vue qui nous occupe. En tous cas, la « protection » n'est pas totale, car on peut déceler une inhibition très nette, en utilisant des doses élevées de NaCl, ou de NaI : en opérant sur des extraits de poumon d'*Helix pomatia* en présence de 0,725 mM. de NaCl, on peut mettre en évidence une inhibition de 41 % de l'activité enzymatique originelle, et de 60 % en présence de 0,071 mM. de NaI. On remarque, dans ce dernier exemple, que l'inhibition n'est pas totale, contrairement à ce que l'on observe dans les mêmes conditions avec l'enzyme préparé.

Il n'est donc pas étonnant que les auteurs aient pu utiliser indifféremment, pour l'étude de l'anhydrase, des extraits de tissu faits à l'eau distillée, ou à l'eau salée (que l'on n'a pas employée très hypertonique), sans percevoir l'effet inhibiteur de NaCl; J. K. W. FERGUSON, L. LEWIS et J. SMITH en particulier [76].

b) L'INTERPRÉTATION. — Il était désormais possible de justifier la présence de la calcite dans les coquilles, en continuant à considérer l'anhydrase-carbonique comme le facteur essentiel qui oriente la précipitation du calcaire vers l'aragonite. En effet, il se forme de la calcite quand le manteau ne contient pas d'anhydrase, ou quand l'anhydrase à laquelle il donne naissance est inhibée par l'eau de mer. Chez *Gryphea angulata*, ou toute la surface du manteau est baignée par l'eau de mer, la coquille est calcitique. Chez *Mytilus edulis*, le bourrelet palléal est placé au contact de l'eau de mer: toute la zone com-

prise entre l'insertion palléale et la bordure de la coquille est calcitique, à l'exception toutefois d'une étroite bande de nacre blanchâtre dont la largeur varie d'un spécimen à l'autre, et qui suit l'insertion palléale sur toute sa longueur. Cette bande est en aragonite; mais comme elle est située contre l'insertion, on peut se demander si l'eau de mer arrive à s'insinuer jusque-là ? Il est possible qu'il n'en soit rien, puisque le tissu y est plaqué contre le calcaire, et c'est pourquoi il se formerait de l'aragonite en cet endroit.

Chez *Chlamys varius*, quelle que soit la teneur du manteau en diastase (je n'ai pas eu l'occasion de l'étudier), on devait s'attendre à trouver de la calcite, puisque le manteau est libre dans le milieu. Chez *Pecten maximus*, même si la bandelette palléale contient de l'anhydrase que les substances libérées au cours du broyage ne laissent pas fonctionner, l'eau de mer doit l'inhiber quand elle est libérée dans le milieu. Chez *Patella vulgata*, il existe une insertion du manteau située à mi-distance entre le sommet et la bordure de la coquille. Mais cette insertion ne couvre que les $3/4$ de la circonférence correspondant à l'intersection du plan dans lequel elle se trouve et du cône que représente la coquille de la Patelle. Le manteau est libre depuis l'insertion jusqu'à l'ouverture de la coquille. Il se poursuit à l'intérieur par un tégument mince qui enveloppe les organes du Mollusque. L'eau de mer pénètre plus ou moins vers le toit de la coquille par le $1/4$ de l'insertion qui n'est pas fermé. Il en résulte que l'on doit trouver de la calcite dans la couche des prismes de la coquille, dans la nacre sécrétée par la partie libre du manteau, et, au fond, de la calcite mêlée d'aragonite.

Comment peut-on envisager ce qui se passe chez les Mollusques dont le manteau n'est pas inséré sur la coquille, et qui possèdent une couche de prismes en calcite et une couche de nacre en aragonite, ce qui est le cas de *Purpura lapillus* et de *Fissurella picta* ? Dans le cadre des phénomènes que nous connaissons, on ne peut faire intervenir qu'une disposition anatomique et un comportement de l'animal tels, qu'au moment où le manteau secrète, il se trouve appliqué contre la paroi calcaire, sauf en ce qui concerne le bourrelet palléal. Lors de la croissance en longueur, celui-ci serait pleinement au contact de l'eau de mer (1). Cela est facile à imaginer chez *Fissurella picta*; la coquille, en forme de cône très évasé, est percée au sommet. On distingue à la face inférieure un bourrelet calcaire, une zone ovale incomplètement fermée à l'intérieur de l'insertion, et une bordure étroite allant de l'insertion au bord de la coquille. Cette bordure est beaucoup moins large que ne l'est son homologue chez la Patelle, et il est évident que le bourrelet palléal peut être maintenu appliqué contre la paroi, de telle sorte que l'eau de mer n'y pénètre pas. De même l'ouverture du sommet est constamment bouchée par la chair de l'animal.

On pourrait interpréter de la même façon le cas de *Haliotis tuberculata* : les trous qui garnissent la coquille sont constamment fermés par des prolongements du manteau. Celui-ci est composé de deux lobes séparés, bien abrités sous la coquille et protégés par la masse charnue du pied dont le bourrelet externe déborde suffisamment la coquille pour en assurer la fermeture complète à l'état de repos, de sorte qu'on ne saurait s'étonner de trouver uniquement de l'aragonite dans cette coquille (avec des traces plus ou moins fortes de calcite, variations que l'on peut relier facilement à des différences individuelles).

Mais cette fois l'explication comporte une part d'incertitude qui conduit à penser que la solution envisagée n'a pas mis en évidence tous les éléments du problème. Cela apparaît encore plus clairement si l'on considère les cas de *Littorina littorea* et de *Littorina obtu-*

(1) Je fais provisoirement abstraction du rôle éventuel du *periostracum*; j'y reviendrai bientôt.

sata. Il faudrait admettre qu'au moment de la sécrétion de la coquille, une partie du manteau, outre le bourrelet palléal, est baignée par l'eau de mer. Il suffirait, pour qu'il en soit ainsi, que l'animal reste en légère extension lors de la sécrétion palléale. Admettons-le provisoirement. Mais alors, il faudrait croire que les autres Gastéropodes côtiers, *Calliostoma zizyphinum* ou *Trochocochléa crassa*, ne se comportent pas de la même façon, puisque la nacre de leur coquille est entièrement en aragonite ? Il n'y a pas d'objection de principe à cette hypothèse : le comportement d'une espèce dans une situation déterminée n'est pas forcément le même que celui d'une autre espèce. Malheureusement, puisque ce raisonnement m'amène à faire intervenir dans l'explication non seulement le milieu dans lequel vivent les animaux, mais encore le comportement individuel de chaque espèce, je suis bien obligé de constater que nous ne possédons aucun document sur cette question du comportement, et, au point où j'en étais parvenu, je ne pouvais prendre définitivement position.

Pourtant, il était désormais difficile d'affirmer que l'anhydrase est étrangère à la formation de l'aragonite; sinon, comment pouvait-on justifier la découverte de l'inhibition de l'enzyme par l'eau de mer et les conséquences qui en étaient résultées ? Mais il restait à savoir pourquoi, malgré un contact possible, si l'on en juge par les dispositions anatomiques, entre l'eau de mer et l'épithélium sécréteur chez certains animaux, pourquoi il se forme quand même de l'aragonite ? D'autre part, il était impossible de concevoir qu'il n'y ait pas d'anhydrase-carbonique dans le manteau ou les portions de manteau qui donnent naissance à de l'aragonite. Or, à ce sujet, l'étude d'*Arca Noe* est particulièrement suggestive. Ce Mollusque possède une coquille aragonitique. Son manteau ne montre pas d'insertion sur la coquille, mais quand on cherche à l'en séparer, on constate qu'il y a des adhérences nombreuses, de telle sorte qu'il semble difficile à l'eau de mer de s'insinuer entre la surface du manteau et la coquille. Le *periostracum* est aussi très consistant et maintient le bourrelet palléal appliqué contre le bord de la coquille. Cependant (sans faire, encore une fois, et provisoirement, intervenir le *péριοstracum*), il apparaît possible qu'il y ait un contact entre le bourrelet palléal et l'eau de mer environnante. Malgré tout, il se forme de l'aragonite. De plus, les k_c mesurés sur les extraits du manteau ne permettent pas d'affirmer qu'il y a de l'anhydrase dans ce tissu. Ce cas n'est pas unique. Chez *Anodonta cygnea*, *Unio* (species), au cours de certains dosages sur les manteaux de *Dosinia exoleta*, *Sphaerium riviculum*, on ne trouve pas de diastase; mais sans aucune exception, tous ces extraits présentent les anomalies, dans le dégagement de CO_2 , que j'ai précédemment signalées et qui laissent à penser qu'il se passe dans ces expériences quelque chose de nouveau; je répéterai d'ailleurs qu'il est possible de choisir, parmi les explications que l'on peut envisager, celle qui fait intervenir l'existence d'une diastase voisine de l'anhydrase-carbonique des globules rouges, et qui serait moins sensible à l'action de l'eau de mer; celle qui attribue aux effecteurs libérés par le broyage du tissu l'orientation dans le sens de la synthèse, du fonctionnement de l'anhydrase-carbonique, qui serait présente, mais ne pourrait se manifester dans les conditions de l'expérience; celle enfin qui admet simultanément ces deux hypothèses.

En présence de ces difficultés, je recherchai l'occasion de soumettre l'hypothèse originelle à une nouvelle épreuve. Cette occasion se présenta rapidement. En effet, l'eau de mer inhibe l'anhydrase-carbonique, grâce au chlorure de sodium qu'elle contient. Mais, chez les Lamellibranches marins, le sang contient autant de chlorure de sodium que l'eau de mer environnante. Or, il existe entre le manteau et la coquille, chez tous les Mollusques,

un liquide extrapalléal qui provient du sang, par simple diffusion à travers certains territoires perméables du tissu palléal (MANIGAULT, *loc. cit.*). L'identité de composition du sang et du liquide extrapalléal, au moins chez l'Anodonte et vraisemblablement chez tous les Mollusques, avait d'ailleurs été démontrée par de WAELE (*loc. cit.*). Le liquide extrapalléal des Lamellibranches marins contient donc autant de NaCl que l'eau de mer. Dans ces conditions, l'anhydrase libérée par le manteau devrait toujours être inhibée et la nacre des coquilles chez les Lamellibranches marins devrait toujours être faite de calcite, que le manteau soit inséré sur la coquille ou qu'il ne le soit pas. Il n'en est rien, la nacre est le plus souvent aragonitique. Fallait-il renoncer à l'intervention de l'anhydrase-carbonique (1) ?

Je remarquai d'abord qu'il était arbitraire de comparer une solution presque purement minérale : l'eau de mer (qui contient un peu de matière organique) et un liquide biologique : le liquide extrapalléal ou le sang des Mollusques, qui contiennent énormément de matière organique. N'avais-je pas eu l'occasion de montrer que certaines substances organiques provenant des extraits de tissu pouvaient gêner l'inhibition ? Malgré ces considérations, on ne pouvait évidemment se fier qu'à l'expérience. Mais si le point de départ de ces recherches était exact, le liquide extrapalléal *ne devait pas inhiber* l'anhydrase-carbonique.

2. — INFLUENCE DU LIQUIDE EXTRAPALLÉAL ET DU SANG DE QUELQUES MOLLUSQUES SUR L'ANHYDRASE-CARBONIQUE

Les Moules peuvent fournir des quantités relativement considérables de liquide extrapalléal. Il suffit, pour s'en procurer, d'écarter légèrement les valves de la coquille avec la lame d'un couteau, de secouer pour éliminer l'eau de mer retenue par l'animal, puis de détacher l'insertion palléale à l'aide d'un manche de scalpel sans léser le manteau, et de recueillir le liquide qui s'écoule. Il y en a des quantités variables d'un exemplaire à l'autre; j'ai pu, sur des Moules de grande taille (7,5 cm sur 3,5 cm) en avoir 1 cm³ par individu, c'est-à-dire 1/2 cm³ en moyenne par valve. Du côté du bourrelet palléal, il n'y a pas beaucoup de liquide extrapalléal, mais sa présence n'est pas contestable (Cf. MANIGAULT, *loc. cit.*). Pour expérimenter sur un volume de liquide suffisant, j'ai mélangé les liquides recueillis sur un lot de Moules : c'est donc sur un liquide extrapalléal moyen que j'ai opéré.

Un heureux hasard me permit d'observer, sur le premier lot, un liquide extrapalléal qui possédait une activité diastasique propre, et même considérable, puisque le k_c mesuré était de : 0,0127, alors que le témoin à l'eau distillée est de 0,0060, ce qui représente 0,019 U/cm³. Il est impossible d'expliquer cette constatation si l'on n'admet pas que l'anhydrase (et vraisemblablement d'autres enzymes) peuvent être libérés dans le milieu extérieur. Bien que cela fut probable, c'est une sécurité que de pouvoir le prouver; il s'agit bien d'une activité anhydrique. En effet, j'ai dialysé ce liquide dans un boudin de cellophane capable d'arrêter les molécules de polypeptides de poids moléculaire supérieur à 12 000. Je l'y ai laissé plus de 24 heures contre de l'eau distillée fréquemment

(1) Bien que les cas de la coquille d'*Argonauta* et de *Teredo navalis* semblent devoir se ranger dans les séries calcitiques dont j'interprète l'existence, il est probable qu'il faut les en séparer; la sécrétion du calcaire ne s'y fait pas comme dans les autres coquilles.

renouvelée, et après avoir filtré le liquide dialysé, j'ai pu constater qu'il avait toujours la même activité diastasique. De plus, si à 3 cm³ de ce liquide extrapalléal, on ajoute 1 cm³ de NaI à la concentration de 27 g/litre, le k_d du liquide examiné passe de : 0,0039 à 0,0005, ce qui revient à dire que la diastase a été inhibée par NaI, dans des proportions tout à fait comparables à celles que l'on obtient avec des solutions d'anhydase préparée (1).

Lors de la dialyse, il se fait un abondant dépôt de matière organique. Si l'on recueille ce dépôt et qu'on le replace dans une solution saline équivalente à l'eau de mer, il ne se redissout pas, ou du moins très peu. Il faut donc en conclure que le départ du NaCl de la solution après dialyse a fait précipiter certaines protéines dissoutes en les dénaturant.

Je n'ai pas retrouvé d'activité diastasique dans les liquides extrapalléaux des autres lots que j'ai examinés, avec ou sans dialyse.

Si l'on mélange à tous ces liquides de l'anhydase-carbonique en solution, on constate : que non seulement l'enzyme n'est pas inhibé au sein du liquide extrapalléal, mais encore qu'il est activé, parfois même dans des proportions considérables. Le premier lot m'avait déjà prouvé que l'anhydase n'y était pas inhibée puisqu'elle fonctionnait dans le liquide extrapalléal. Mais il faut ajouter qu'il existe un puissant activateur de l'anhydase-carbonique dans ce liquide. Certes, les pourcentages d'activation varient d'un lot à l'autre. Ils peuvent être de 25 %, de 38,3 %, mais j'en ai mesuré de : 200 % et de 240 %, l'activité de la solution passant de $k_d = 0,0038$ dans l'eau distillée à 0,00985 dans le liquide extrapalléal. Les résultats ne varient pas après dialyse; par conséquent, il est certain que l'activateur est une substance organique, de poids moléculaire supérieur à 12 000. D'autre part, la comparaison d'un liquide extrapalléal dépourvu d'activité propre avec un témoin à l'eau distillée met en évidence un dégagement de CO₂ beaucoup plus considérable pour le liquide extrapalléal, sans variation des constantes de vitesse. C'est le phénomène inverse de celui que j'ai décrit avec certains extraits de tissu. Il prouve, en tous cas, indépendamment de l'action d'un activateur, que le CO₂ libéré au sein du liquide extrapalléal en diffuse plus facilement qu'en solution aqueuse, et l'importance de cette remarque ne saurait être sous-estimée par ses conséquences biologiques.

Il pouvait être intéressant de faire une étude semblable à celle-ci sur le sang des Mollusques. Il n'est pas facile de s'en procurer sur la Moule; c'est pourquoi j'ai travaillé sur *Gryphea angulata* où la cavité péricardique est relativement volumineuse et facile à atteindre puisqu'elle se trouve à proximité du muscle adducteur. En plongeant dans le ventricule une aiguille placée à l'extrémité d'une seringue, on peut aspirer un peu de sang; on ne peut éviter qu'il ne s'y mêle un peu d'eau de mer, quel que soit le soin que l'on mette à vider l'Huitre de son contenu liquide. J'ai dû opérer sur 2 douzaines 1/2 de Gryphées pour recueillir suffisamment de liquide : 7 à 8 cm³.

Je n'ai pas trouvé d'anhydase dans le sang de l'Huitre. Mais j'ai pu noter que le CO₂ en diffuse aussi, plus facilement que dans l'eau. L'anhydase préparée n'est pas inhibée par le sang de *Gryphea angulata*.

Si l'on dialyse ce liquide, on observe de nouveau la formation d'un dépôt de matière

(1) C'est en diluant le produit pur que k_d passe de : 0,0067 à 0,0039, et cette diminution de l'activité enzymatique avec la dilution prouve à elle seule que l'on est en présence d'anhydase.

organique. Le liquide dialysé semble avoir un effet légèrement activateur, le témoin donne par exemple : $k_d = 0,0735$, et le sang dialysé : 0,084; mais de tels écarts ne sont pas suffisamment significatifs pour que l'on en tienne compte.

Enfin, si l'on mélange du liquide cavitaire au liquide extrapalléal de Moule dans les proportions de 50 et 50 %, on élimine pratiquement l'effet activateur de ce liquide.

Bien entendu, l'absence d'activateur dans le sang du lot d'Huîtres que j'ai étudié ne signifie pas que le liquide extrapalléal de ces mêmes Huîtres soit dépourvu d'activateur, mais il suffit d'observer la surface du manteau d'une Gryphée pour se rendre compte qu'il y a certainement peu de liquide extrapalléal et que ce liquide est par ailleurs mélangé à l'eau de mer.

J'ai comparé ces résultats à ceux que l'on obtient en étudiant le liquide extrapalléal d'un Lamellibranche d'eau douce, l'*Anodonte*. J'ai pu, sur un seul exemplaire, de grande taille il est vrai, recueillir 35 cm³ de liquide extrapalléal, incolore, consistant, par le même procédé que j'ai utilisé sur les Moules. Il ne présentait pas d'activité anhydrique propre, mais il activait considérablement l'anhydrase-carbonique : de 200 à 280 %.

L'hypothèse de départ pouvait donc être maintenue, peut-être même renforcée. Au sein du liquide extrapalléal l'enzyme se trouve dans les meilleures conditions possibles de fonctionnement; non seulement il y est activé, mais encore le pH du liquide extrapalléal, comme je l'ai montré dans le premier chapitre, est voisin de 8, alors que le pH optimum de l'anhydrase est de 8,1.

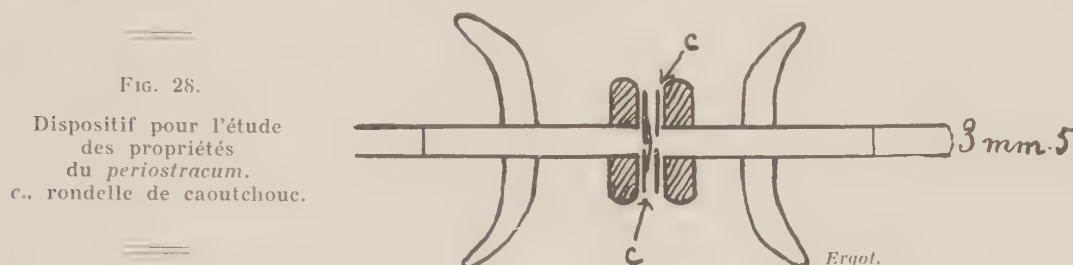
Il restait cependant un dernier point à éclaircir. J'ai admis jusqu'à présent, pour ne pas compliquer à l'extrême les problèmes envisagés, que la bandelette palléale d'un grand nombre de Mollusques pouvait être baignée par l'eau de mer environnante. Mais il existe toujours un periostracum qui prend naissance au fond du sillon palléal et qui adhère intimement à la couche des prismes, de sorte qu'il y a entre la coquille et le manteau une cavité apparemment close de toutes parts, comme j'ai déjà eu l'occasion de l'écrire (fig. 1, C). Il semblait donc impossible que l'eau de mer puisse pénétrer jusqu'au tissu, à moins que le periostracum ne fût perméable.

3. — ROLE DU PERIOSTRACUM

Malgré les apparences on ne peut douter que le periostracum ne soit présent chez tous les Mollusques. Les *Pectinidae*, les *Ostreidae*, la plupart des Mollusques à coquille calcitique, semblent posséder un manteau ou une partie de leur manteau libre dans l'eau de mer ? Selon LEENHARDT [194], il n'en serait rien : le manteau de l'Huitre portugaise est très mobile. Quand il se rétracte, la mince membrane qui le relie à la coquille se rompt, mais le bourrelet palléal s'applique aussitôt sur la nacre et sécrète de nouveau une membrane organique analogue au periostracum. Cette observation n'a pas été faite sur tous les Mollusques dont le manteau ne possède pas d'insertion sur la coquille. Mais elle n'en est pas moins caractéristique. De même les expériences que j'ai décrites dans le § précédent constituent une présomption favorable à l'existence d'un activateur de l'anhydrase dans tous les liquides extrapalléaux, ou du moins à la non-inhibition de la diastase par le liquide extrapalléal.

Dans ces conditions, je devais essayer d'expérimenter sur le periostracum. DE WAELE (*loc. cit.*) avait affirmé que l'eau extérieure pouvait diffuser dans le liquide extrapalléal

de l'*Anodonte* à travers le periostracum. Il ne l'avait pas démontré. LEVETZOW, de son côté, avait prouvé que la matière organique qui forme le substrat des régénérats chez *Helix aspersa* a des propriétés de membrane dialysante (*loc. cit.*). Mais les propriétés d'un régénérat ne sauraient s'identifier sans autres preuves à celles de tous les periostracum. Il est très mal commode, malheureusement, de prélever sur le frais un lambeau de periostracum. *Arca Noe*, dont le periostracum est assez épais, ne le permet pas, car cette membrane adhère tellement à la couche des prismes qu'on ne peut l'en séparer sans laisser la coquille se dessécher. Or, les propriétés du periostracum desséché ne sont pas celles du periostracum frais. Seule, *Mytilus edulis* semblait utilisable, car son periostracum, mince au départ, devient rapidement épais mais n'adhère pas étroitement au calcaire. Il me fut possible d'en séparer des fragments homogènes de quelques millimètres de large. Je les plaçai au centre du dispositif que représente la figure 28.



Deux cannes de verre semi-capillaires de 5 cm de long environ sont disposées en face l'une de l'autre. Chaque extrémité est aplatie et forme une bordure circulaire autour de l'ouverture. Deux rondelles de caoutchouc (c) sont intercalées entre les tubes. Ces rondelles sont percées en leur centre d'un trou de 2 mm de diamètre environ, que l'on recouvre d'un fragment de periostracum. Les deux parties de l'appareil sont appliquées l'une contre l'autre et maintenues solidement par des élastiques reliés aux ergots de verre. On introduit ensuite, à l'aide d'une micropipette munie d'un coude, de l'eau distillée d'un côté, une solution saline de l'autre.

Je me suis servi de solutions de sulfate de cuivre hydraté à diverses concentrations et de solutions de chlorure de sodium ou d'eau de mer. On laisse le dispositif dans une position horizontale, pendant 24 heures, à la température ordinaire, et l'on recueille ensuite l'eau distillée dans un verre de montre. Si l'on a utilisé du So_4Cu , on ajoute un peu d'ammoniaque; si des ions Cu^{++} ont diffusé dans l'eau distillée, il se produit un précipité bleu. Avec les solutions NaCl , on emploie du nitrate d'argent, et l'on observe un précipité blanc.

Les fragments de periostracum sont prélevés soit sur la bordure ventrale de la coquille, soit sur la bordure postérieure. Après une expérience, on constate généralement que le volume des liquides a varié (au départ, il y en a autant des deux côtés; on trace sur le verre un trait de repère au niveau du ménisque). Le volume de la solution saline augmente légèrement, alors que celui de l'eau distillée diminue, mais plus fortement que l'autre n'a augmenté. Cette constatation s'explique par le passage de l'eau dans la solution saline, à travers le periostracum, et en même temps par une légère évaporation, des deux côtés cette fois. Mais, à chacune des six expériences que j'ai effectuées avec des

fragments de periostracum différents, j'ai détecté le passage inverse des sels dans l'eau distillée, tant avec le SO_4Cu qu'avec le NaCl .

Si l'on ferme chacun des tubes par un bouchon de graisse, on peut constater le lendemain que le bouchon situé du côté de l'eau distillée a été aspiré sur une certaine longueur, qui correspond à la diminution du volume d'eau distillée dans le tube. Mais, du côté de la solution saline, le bouchon s'est à peine déplacé, en sens inverse, vers l'extérieur. Je me suis donc demandé si la diminution plus grande du volume de l'eau distillée ne provenait pas de l'évaporation du liquide, par suite d'un mauvais contact, entre le joint de caoutchouc et la bordure. J'ai refait l'expérience en graissant le pourtour des rondelles de caoutchouc, ce qui devait empêcher l'évaporation par le milieu du dispositif, et j'ai constaté que le volume de l'eau avait cette fois très peu diminué. Mais on trouvait du sel dans cette eau. Le periostracum de *Mytilus edulis* a donc les propriétés d'une membrane perméable.

La Moule constitue évidemment un matériel d'étude très favorable, puisqu'on peut utiliser toutes les parties de sa coquille; on avait même pu faire l'étude chimique du periostracum : E. KESSEL [189] a montré qu'on y trouve de « l'albumine et un hydrate de carbone ». On peut y détecter de la tyrosine, de la leucine et du glyocolle. Ce serait donc une glycoprotéine qui contiendrait de la glucosamine; il est certain que la « conchine » dont le periostracum est fait n'est pas équivalente à la chitine. Mais est-il possible d'attribuer à tous les periostracum des propriétés analogues à celles du periostracum de *Mytilus edulis* ? Plus précisément, peut-on affirmer qu'ils sont tous perméables ? Cela n'est évidemment pas possible en l'absence de contrôles plus étendus. Chez *Gryphea angulata*, on pourrait admettre avec quelque vraisemblance que l'eau de mer pénètre entre le manteau et la coquille, entre le moment où le periostracum se rompt, par suite du retrait palléal, et celui où il se reforme, même si ce periostracum est imperméable... Mais, dans ce domaine encore, on ne peut généraliser.

Par conséquent, il était normal de penser qu'il pouvait y avoir quelque chose de plus que l'influence du milieu sur l'anhydrase-carbonique. Mais alors il ne restait plus à considérer qu'un « facteur interne » en somme, touchant la diastase elle-même. Il fallait donc revenir aux hypothèses que les anomalies du dosage de l'anhydrase dans les extraits de tissu nous avaient conduit à exprimer, en particulier on pouvait songer à l'existence de deux ou plusieurs formes de diastase, l'une de ces formes étant susceptible d'être moins sensible que l'autre ou les autres à l'action de l'eau de mer.

C. — Les transformations possibles de l'enzyme et leurs incidences sur la formation du calcaire.

L'étude du spectre d'absorption dans l'ultra-violet me parut la seule méthode susceptible de fournir une indication sur l'existence de plusieurs formes d'anhydrase. Il fallait opérer, cette fois, sur des solutions fortement purifiées et de grande activité. Pour préparer de telles solutions, il suffit, selon le procédé de KEILIN et MANN (méthode B, *loc. cit.*), de traiter les liqueurs à l'alcool-chloroforme dont j'ai déjà eu l'occasion de décrire le mode de préparation. Après dialyse, centrifugation et précipitation au sulfate d'ammo-

nium à saturation, on redissout dans très peu d'eau, on dialyse de nouveau, on centrifuge et l'on termine par une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium. Les précipités redissous dans l'eau donnent aux solutions dont j'ai disposé une activité de 121 U/cm³; ce sont des solutions limpides, avec un léger reflet jaunâtre. Il faut les diluer 4 000 fois pour faire la mesure de leur activité. Les spectres d'absorption dans l'U.-V. des solutions d'anhydase-carbonique sont des spectres non résolubles, sans raies, constitués uniquement par une bande; il existe dans cette bande des régions où les radiations sont absorbées, et leur affaiblissement est une fonction continue de la longueur d'onde (fig. 29).

On encadre les spectres obtenus par les spectres d'arc du Cu, dont les raies d'émission sont assez fines pour que l'on puisse attribuer à chacune d'elles une longueur d'onde précise. Pour les solutions, la loi de DE BEER donne la relation suivante entre l'intensité du faisceau incident I_0 et celle du faisceau émergent I , pour une longueur d'onde λ donnée :

$$I = I_0 \cdot 10^{-Kcx}$$

K = constante d'absorption. — c = concentration du composé dans la solution étudiée. — x = épaisseur de la cuve traversée par l'U. V.

Je ne pouvais caractériser c autrement que par l'activité diastasique, et c'est pourquoi il m'était impossible de calculer K en valeur absolue. Mais, en valeur relative, le problème était différent : en effet, si l'on pose : $\log \frac{I_0}{I} = Kcx$ pour une solution d'anhydase de concentration c , on aura, pour la même solution diluée 1 000 fois : $\log \frac{I_0'}{I'} = K \frac{c}{1\,000} x$. Il suffira de multiplier Kc par 1 000, dans ce deuxième cas, pour retrouver, si la solution suit la loi de DE BEER, le Kc de la solution mère.

Pour évaluer $\frac{I_0}{I}$, on fait d'abord le spectre de la source à travers une cuve qui ne contient que le solvant (de l'eau en l'occurrence), avec des temps de pose variables, t_s , t_{s_1} , t_{s_2} ... On apprécie les noircissements de la plaque à l'aide d'un photomètre et l'on note les déviations d'un spot, que donne une cellule photoélectrique à l'aide de laquelle on prospecte la plaque. La déviation est d'autant plus grande que le spectre est plus clair.

On trace, pour chacun des spectres (source et solution diastasique), la courbe des déviations en fonction des longueurs d'onde; la courbe de la solution étudiée coupe les courbes témoins en un ou plusieurs points. En chacun de ces points, les noircissements sont équivalents. On peut alors appliquer, aux longueurs d'onde correspondantes, la formule de SCHWARZSCHILD qui permet de calculer $\frac{I_0}{I}$:

$$\frac{I_0}{I} = \left(\frac{t_1}{t_0} \right)^n,$$

où t et t_0 sont les temps de pose connus de chacun des spectres considérés, n un coefficient qui dépend de la plaque photographique et qui peut varier de 0,8 à 0,95. Mais les spectres que j'ai comparés étaient généralement situés sur la même plaque; sinon sur 2 plaques différentes, qui étaient traitées de la même façon et développées en même temps. J'ai donc donné à n la valeur 1 pour simplifier.

La figure 29 représente les spectres des solutions suivantes : A = solution mère 121 U/cm³. Cuve de 5 mm; B = solution mère diluée 25 fois. Cuve de 50 mm; C = solution mère diluée 50 fois. Cuve de 50 mm; D = solution mère diluée 1 000 fois. Cuve de 20 mm, et 7 spectres de la source, à des temps de pose différents, le tout encadré des deux spectres d'arc du cuivre. La ligne qui relie 2 raies homologues de ces spectres indique l'emplacement de la longueur d'onde : $\lambda = 2\,618 \text{ \AA}$.

La figure 30 montre les variations des déviations du spot (en ordonnée), en fonction des longueurs d'onde (en abscisse). Les points d'intersection des spectres A, B, C, D, avec les témoins, sont entourés d'un cercle.

La figure 31 représente les variations du coefficient d'absorption dans l'U.-V., en fonction de la longueur d'onde, pour les dilutions : 1/50, 1/100, 1/250, 1/500, 1/750, 1/1 000.

Le spectre d'absorption de la solution mère est un spectre normal de protéine, qui présente donc, chez l'anhydrase-carbonique, une bande d'absorption entre 2 600 et 2 900 Å. On note, sur la figure 30, que l'absorption commence vers 3 000 Å et devient pratiquement totale vers 2 400 Å. Elle présente un maximum vers 2 750 Å. Mais les solutions diluées,

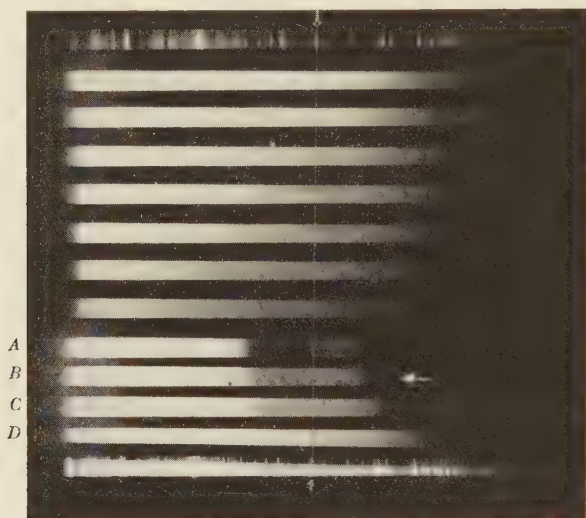


FIG. 29.

Spectres d'absorption,
dans l'U. V.,
de quelques solutions
d'anhydrase-carbonique.

bien qu'elles absorbent l'ultra-violet dans les mêmes intervalles, n'ont pas le même aspect, ni le même coefficient d'absorption K. La loi de DE BEER n'est pas respectée (1). D'une manière générale, K augmente avec la dilution.

Par exemple, pour la solution mère A (fig. 29), on trouve, à 2 750 Å, $Kc = 0,3556$, et pour la même solution diluée 1 000 fois : $Kc = 13,82$ (les c sont égaux de part et d'autre). C'est surtout à partir des dilutions comprises entre 250 et 500 fois que le coefficient K s'accroît considérablement.

On ne saurait d'autre part attribuer ces variations, qui dépassent largement les erreurs d'expérience, à une dénaturation de la diastase par les rayons ultra-violets. Les temps de pose étaient de 180 s. et cela n'est pas suffisant pour justifier des troubles de cet ordre. J'ai refait les mêmes études sur des solutions abandonnées à 12° environ, et j'ai pu constater que le coefficient d'absorption augmentait avec le temps. Bien entendu, ce n'est pas la dilution qui intervient dans ce phénomène, mais il est certain que des transformations se produisent au niveau de la molécule diastasique. Il ne serait d'ailleurs pas étonnant qu'au contact de l'eau, à une concentration quelconque, l'enzyme subisse

(1) Les techniques d'étude quantitative des spectres d'absorption dans l'ultra-violet sont décrites par M. CHATELET, in *Spectres d'absorption visibles et ultra-violets des solutions*. Hermann, 1933.

des changements lents, semblables à ceux que la dilution provoque instantanément. On ne peut relier cette observation qu'à un phénomène connu : la perte spontanée, avec le temps, de l'activité enzymatique ? Si l'on ajoute aux solutions d'anhydrase des traces de phosphate de sodium qui en élèvent le pH, le coefficient K s'accroît également.

On n'avait pas fait, à ce jour, d'étude quantitative dans l'ultra-violet des solutions

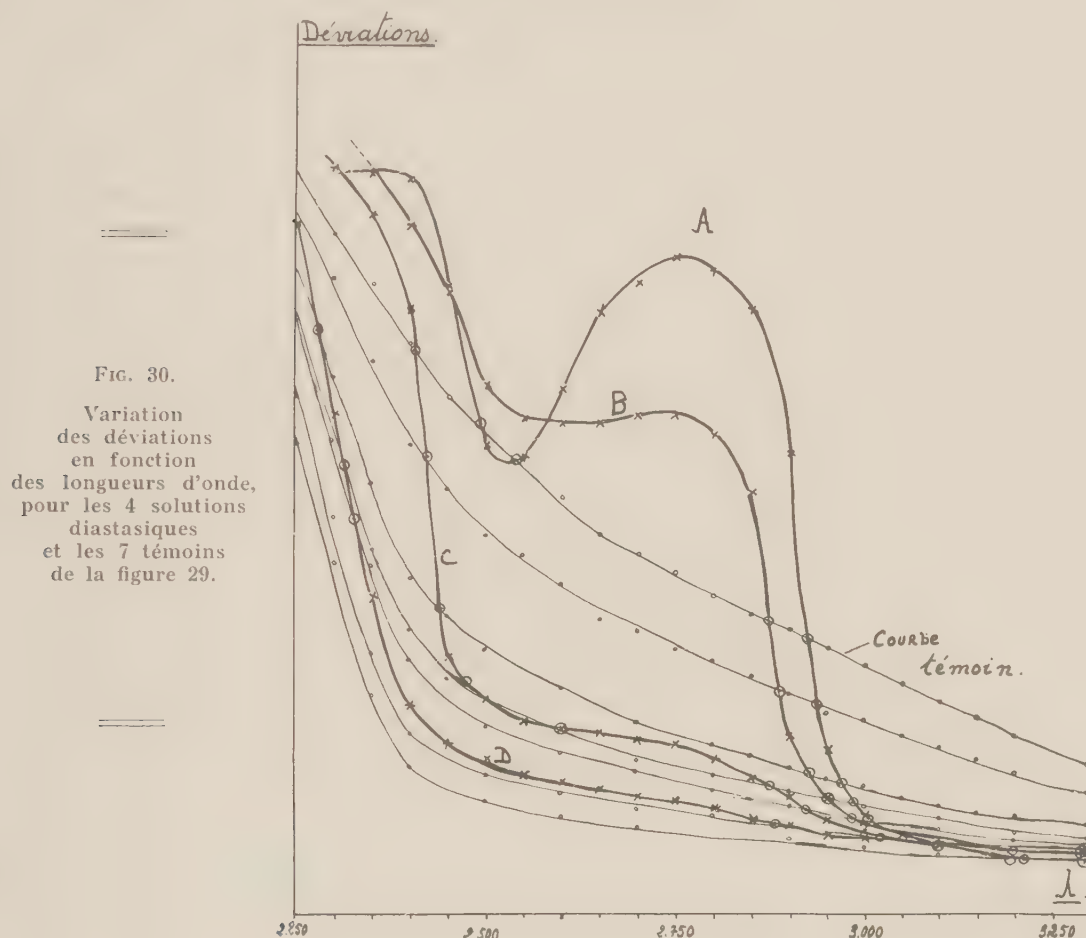


FIG. 30.

Variation
des déviations
en fonction
des longueurs d'onde,
pour les 4 solutions
diastases
et les 7 témoins
de la figure 29.

enzymatiques. On avait simplement signalé (*in VAN GOOR, loc. cit.*) que l'examen dans l'ultra-violet du spectre de l'anhydrase ne révélait aucune raie. Il se peut que le coefficient d'absorption dans l'ultra-violet ne subisse pas, chez d'autres enzymes, les variations qu'il subit chez l'anhydrase-carbonique. Il serait alors intéressant d'étendre à d'autres diastases l'étude qui vient d'être faite. Cela permettrait des comparaisons suggestives, plus spécialement avec les enzymes dont la composition est connue.

Il ne semble pas qu'on doive attribuer directement à des variations de pH, l'élévation du coefficient d'absorption : le pH de la dilution 1/25 et celui de la dilution 1/50, par exemple, étaient de : 7,65, alors que les K 1/25 et K 1/50 sont différents. On est conduit à envisager les possibilités suivantes pour expliquer le phénomène : séparation de

la protéine active et des protéines inactives qui la couvrent (1), scission de la molécule diastasique en deux ou plusieurs parties; mélange, en équilibre, de deux ou plusieurs formes d'anhydrase dont l'une prédominerait à certaines dilutions, solvation... sans que l'on puisse choisir, pour l'instant, entre ces diverses interprétations.

Ce qui reste acquis de toutes façons, c'est que les conditions physiques et chimiques qui règnent dans les cellules où l'anhydrase se forme imposent, dans chaque type de cellule, une forme de la diastase qu'il est désormais permis de concevoir sous des aspects différents dans des cellules différentes. En particulier, dans les cellules sécrétrices qui

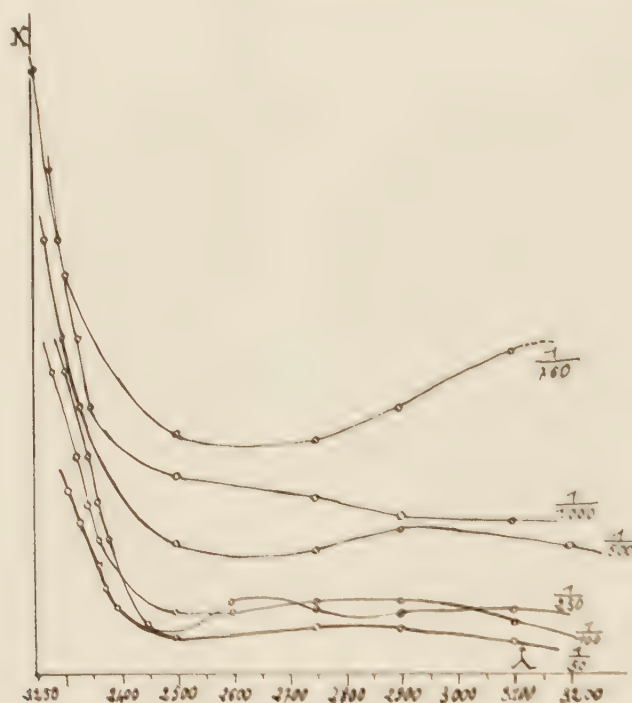


Fig. 31.
Variations de K
en fonction
de λ pour les dilutions :
1/50, 1/100, 1/250,
1/500, 1/750, 1/1000.

subissent des remaniements considérables quand elles entrent en activité, il est désormais certain que l'on ne pourra apprécier la forme de la molécule d'anhydrase qu'en fonction des produits qui l'entourent, et plus spécialement de la quantité d'eau cellulaire au milieu de laquelle elle évolue.

Enfin et surtout, on peut constater que l'hypothèse qui nous a conduit à étudier le spectre d'absorption de l'anhydrase-carbonique dans l'ultra-violet s'accorde parfaitement avec les résultats de cette étude; cette constatation nous permet d'espérer qu'en poursuivant les recherches dans la même voie, on pourra répondre à toutes les questions qui se rattachent à cette interprétation (2), et qu'en particulier on pourra savoir si l'une des formes d'anhydrase n'est pas inhibée par l'eau de mer.

(1) Les préparations anhydriques ne sont évidemment pas des préparations pures, même quand la purification est poussée au maximum et que l'on travaille sur des produits cristallisés, car, dans ce cas, on a quelques raisons de croire que des protéines homéomères cristallisent avec la diastase.

(2) Je n'ai pu savoir si la reconcentration des solutions diluées d'anhydrase redonnait à K les valeurs originelles. Il aurait fallu, pour expérimenter dans ce sens, évaporer sous vide; mais, alors, on dénature plus ou moins la diastase et l'opération n'est plus significative.

D'une manière générale, nous pouvons dire qu'en aucun cas, l'hypothèse de l'intervention de l'anhydrase-carbonique dans le déterminisme des formes minéralogiques du calcaire n'a été infirmée par l'expérience. Certes, la grossièreté relative des moyens d'investigation dont nous disposons pour pénétrer dans l'intimité des phénomènes de la vie ne nous permet pas encore de saisir le détail des réactions; certes, nous éprouvons des difficultés pour tout expliquer avec précision, mais *dans l'ensemble*, les recherches effectuées sur l'anhydrase-carbonique mettent en lumière l'intervention de cet enzyme dans la formation des coquilles; elles en situent d'autre part les conditions et les limites.

Il faudrait, pour aller plus loin, faire un travail considérable de biophysique.

Je crois devoir rappeler également qu'il a été nécessaire de faire intervenir dans l'explication : l'action du milieu et le comportement des animaux en des circonstances déterminées. En ce qui concerne le milieu, il a même fallu distinguer : le milieu, au sens étroit, dans lequel la molécule diastatique évolue; le milieu, au sens large, dans lequel l'animal vit tout entier, et qui peut se mêler au milieu précédemment défini. Toutes ces notions rejoignent évidemment les conceptions modernes (auxquelles elles apportent quelques éléments nouveaux), conceptions qui n'accordent à l'étude biologique une valeur que si elle tient compte des interactions entre l'individu et le milieu; et c'est, dans le domaine philosophique, une garantie de plus en faveur de l'intervention de l'anhydrase-carbonique dans les phénomènes qui conduisent à la formation de l'aragonite.

D. — Tableaux et notes annexes.

La constante de vitesse déterminée par GUGGENHEIM [92] est-elle bien celle de la réaction de décomposition du CO_2NaH utilisée dans la mesure d'activité de l'anhydrase-carbonique ?

Tout se passe, dans cette réaction, comme si :

1 mol. CO_2NaH donnait : 1 mol. CO_2 et H_2O .

Soit a la quantité initiale de bicarbonate.

Soit x la quantité décomposée à l'instant t .

Il reste $(a-x)$ de bicarbonate. La vitesse de la réaction s'exprime par : $\frac{dx}{dt} = K (a-x)$,
 K = constante de vitesse.

Soit : $\frac{dx}{a-x} = Kdt$. Intégrons :

Soit $-L (a-x) = Kt + \text{constante d'intégration}$.

Si $t = 0$, $x = 0$. La constante d'intégration est donc $= -La$.

Donc : $La - L(a-x) = Kt$, ou : $L \frac{a}{a-x} = Kt$ (1)

Soit p la pression propre du CO_2 dégagé. Elle est proportionnelle à x : $p = k'x$.

Soit p_∞ la pression finale quand tout le dégagement est fait : $p_\infty = k'a$,

$$\text{d'où (1) : } L \frac{\frac{p_\infty}{k'}}{\frac{p_\infty}{k'} - \frac{p}{k'}} = Kt. \quad \text{ou : } L \frac{p_\infty}{p_\infty - p} = Kt. \quad (2)$$

Reprenons : Soit p à 2 temps t_1 et t_2 :

$$L \frac{p_\infty}{p_\infty - p} = Kt_1 \quad L \frac{p_\infty}{p_\infty - p} = Kt_2.$$

Faisons la différence :

$$L \frac{\frac{p_{\infty}}{p_{\infty}-p_2}}{\frac{p_{\infty}}{p_{\infty}-p_1}} = K (t_2-t_1), \quad \text{ou : } L \frac{p_{\infty}-p_1}{p_{\infty}-p_2} = K (t_2-t_1). \quad (3)$$

Il s'agit donc, puisqu'on doit faire des mesures sans avoir besoin que la réaction soit complète, d'évaluer p_{∞} sans le mesurer, ou de l'éliminer.

D'abord, évaluons p_{∞} :

Faisons 3 mesures aux temps t_1, t_2, t_3 tels que : $t_2-t_1 = t_3-t_2$.

On a :

$$\begin{aligned} L \frac{p_{\infty}-p_1}{p_{\infty}-p_2} &= K (t_2-t_1), \\ L \frac{p_{\infty}-p_2}{p_{\infty}-p_3} &= K (t_3-t_2), \quad \text{d'où : } \frac{p_{\infty}-p_1}{p_{\infty}-p_2} = \frac{p_{\infty}-p_2}{p_{\infty}-p_3} \\ \text{ou : } (p_{\infty}-p_2)^2 &= (p_{\infty}-p_1)(p_{\infty}-p_3); \quad p_{\infty}^2-2p_{\infty}p_2+p_2^2 = p_{\infty}^2-p_{\infty}(p_1+p_3)+p_1p_3; \\ p_{\infty}(p_1+p_3-2p_2) &= p_1p_3-p_2^2, \quad \text{ou : } p_{\infty} = \frac{p_2^2-p_1p_3}{2p_2-p_1-p_3}. \end{aligned} \quad (4)$$

Cette formule est précisément la formule (2) de GUGGENHEIM :

$$p_{\infty} = p_1 + \frac{(p_2-p_1)^2}{2p_2-p_1-p_3}; \quad (5)$$

$$\text{En effet : } \frac{p_1(2p_2-p_1-p_3)+p_2^2-2p_1p_2+p_1^2}{2p_2-p_1-p_3} = \frac{2p_2p_1-p_1^2-p_1p_3+p_2^2-2p_1p_2+p_1^2}{2p_2-p_1-p_3} = \frac{p_2^2-p_1p_3}{2p_2-p_1-p_3}.$$

Mais il est plus pratique d'éliminer p_{∞} .

Éliminons p_{∞} .

On effectue une mesure au temps $t = 0$; une au temps t' et une au temps $t' + \tau$, τ étant un intervalle que nous supposons constant. Soient les temps 0 et t' : (3) nous donne :

$$L \frac{p_{\infty}-p_0}{p_{\infty}-p_{t'}} = Kt'; \quad \text{ou : } p_{\infty}-p_{t'} = (p_{\infty}-p_0) e^{-Kt'}. \quad (6)$$

Soient les temps 0 et $t' + \tau$, (3) nous donne :

$$p_{\infty}-p_{t'+\tau} = (p_{\infty}-p_0) e^{-K(t'+\tau)} = (p_{\infty}-p_0) e^{-Kt'} e^{-K\tau} \quad (7)$$

Soustrayons (7) de (6) :

$$p_{\infty}-p_{t'}-p_{\infty}+p_{t'+\tau} = (p_{\infty}-p_0) e^{-Kt'} (1-e^{-K\tau}),$$

$$\text{ou : } p_{t'+\tau}-p_{t'} = (p_{\infty}-p_0) (1-e^{-K\tau}) e^{-Kt'}; \quad L (p_{t'+\tau}-p_{t'}) = L [(p_{\infty}-p_0) (1-e^{-K\tau})] e^{-Kt'},$$

$$\text{ou : } Kt' + L (p_{t'+\tau}-p_{t'}) = L [(p_{\infty}-p_0) (1-e^{-K\tau})] = \text{Constante } A,$$

si τ est constant.

Conséquences. — Si on fait des mesures à des temps divers t' , et si à chaque mesure on en fait correspondre une autre à un intervalle τ après, on a :

$$L (p_{t'+\tau}-p_{t'}) = -Kt' + A.$$

C'est une droite ne passant pas par l'origine et dont le coefficient angulaire changé de signe est la constante de vitesse.

Pour calculer K, on peut faire des mesures identiques à 3 temps ;

$$t_x, t_\beta, t_\gamma, \text{ tels que } t_\beta - t_x = t_\gamma - t_\beta = \tau.$$

Dès lors :

$$L(p_\gamma - p_\beta) = -Kt_\beta; \quad L(p_\beta - p_x) = -Kt_x, \quad \text{ou : } L \frac{p_\gamma - p_x}{p_\beta - p_x} = -K\tau, \quad (8)$$

qui donne K.

Donc, la constante de GUGGENHEIM et de MITCHELL est bien la même que la constante de vitesse utilisée dans les dosages d'activité de l'anhydrase-carbonique.

TABLEAU XII. — LISTE DES k_0 MESURÉS A DIVERSES TEMPÉRATURES

0,5 à 1°		1 à 2°		2 à 3°		3 à 4°		4 à 5°	
N°s	k_0	N°s	k_0	N°s	k_0	N°s	k_0	N°s	k_0
1.	0,0061	41.	0,0067	93.	0,0080	120.	0,0077	134.	0,0084
2.	0,0070	42.	0,0067	94.	0,0070	121.	0,0057	135.	0,0064
3.	0,0055	43.	0,0070	95.	0,0043	122.	0,0076	136.	0,0067
4.	0,0070	44.	0,0047	96.	0,0092	123.	0,0057	137.	0,0097
5.	0,0070	45.	0,0040	97.	0,0075	124.	0,0070	138.	0,0081
6.	0,0050	46.	0,0050	98.	0,0049	125.	0,0078	139.	0,0077
7.	0,0067	47.	0,0072	99.	0,0073	126.	0,0087	140.	0,0087
8.	0,0078	48.	0,0063	100.	0,0084	127.	0,0052	141.	0,0078
9.	0,0046	49.	0,0047	101.	0,0063	128.	0,0075	142.	0,0068
10.	0,0060	50.	0,0080	102.	0,0066	129.	0,0083	143.	0,0089
11.	0,0060	51.	0,0067	103.	0,0052	130.	0,0084	144.	0,0078
12.	0,0050	52.	0,0061	104.	0,0060	131.	0,0089	145.	0,0077
13.	0,0080	53.	0,0054	105.	0,0061	132.	0,0077	146.	0,0067
14.	0,0055	54.	0,0057	106.	0,0070	133.	0,0078	147.	0,0092
15.	0,0060	55.	0,0073	107.	0,0067			148.	0,0065
16.	0,0046	56.	0,0073	108.	0,0080			149.	0,0079
17.	0,0046	57.	0,0066	109.	0,0060			150.	0,0072
18.	0,0032	58.	0,0061	110.	0,0055			151.	0,0080
19.	0,0040	59.	0,0038	111.	0,0070				
20.	0,0042	60.	0,0052	112.	0,0074				
21.	0,0069	61.	0,0066	113.	0,0077				
22.	0,0073	62.	0,0064	114.	0,0067				
23.	0,0084	63.	0,0077	115.	0,0070				
24.	0,0063	64.	0,0054	116.	0,0066				
25.	0,0076	65.	0,0065	117.	0,0073				
26.	0,0063	66.	0,0058	118.	0,0067				
27.	0,0054	67.	0,0066	119.	0,0046				
28.	0,0040	68.	0,0059						
29.	0,0052	69.	0,0061						
30.	0,0076	70.	0,0067						
31.	0,0065	71.	0,0067						
32.	0,0069	72.	0,0064						
33.	0,0061	73.	0,0069						
34.	0,0046	74.	0,0049						
35.	0,0052	75.	0,0081						
36.	0,0076	76.	0,0073						
37.	0,0076	77.	0,0082						
38.	0,0069	78.	0,0087						
39.	0,0054	79.	0,0075						
40.	0,0038	80.	0,0075						
		81.	0,0046						
		82.	0,0069						
		83.	0,0070						
		84.	0,0076						
		85.	0,0072						
		86.	0,0061						
		87.	0,0080						
		88.	0,0077						
		89.	0,0054						
		90.	0,0080						
		91.	0,0066						
		92.	0,0072						

TABLEAU XIII

DOSAGES D'ANHYDRASE-CARBONIQUE DANS LE MANTEAU D'*Helix aspersa* (Mull.), EN FONCTION DES SAISONS

Date et caractéristiques	N ^{os}	Poids total (g)	Tissu examiné	Poids frais (P. f.) en mg	Dilution	Azote (N) dans P. f. en mg	Activité U, 25 mg N
PRINTEMPS							
21-5-49, non bordé.	1.	7,5	Poumon.	28	2	0,720	2,334
					4		2,706
23-5-49, non bordé.	2.	7	Btte palléale.	53	3	1,181	0,868
			Poumon.	17	2	0,510	2,434
23-5-49, non bordé.	3.	7	Btte palléale.	34	2	0,968	0,677
24-5-49, non bordé.	4.	7,5	Btte palléale.	47	2	1,002	0,460
			Poumon.	31,5	2	0,976	1,530
25-5-49, non bordé.	5.	12	Btte palléale.	51	2	0,861	0,934
bordé.	6.	8,5	Poumon.	33	2	0,934	2,054
27-5-49, non bordé.	7.	7,5	Poumon.	36	2	0,940	2,638
non bordé.	8.	6,5	Poumon.	21	2	0,661	2,815
non bordé.	»	»	Btte palléale.	27,5	2	0,693	0,686
28-5-49, bordé.	9.	7,5	Btte palléale.	26,5	2	0,766	0,446
30-5-49, bordé.	10.	10	Btte palléale.	52,5	3	1,00	0,646
			Poumon.	41	3	1,213	2,683
bordé.	11.	8	Btte palléale.	25	2	0,602	0,546
31-5-49, bordé.	12.	8,5	Poumon.	33,5	3	0,797	3,964
			Btte palléale.	26	2	0,556	0,668
bordé.	13.	8,5	Poumon.	24	2	0,739	2,815
1-6-49, bordé.	14.	9,5	Btte palléale.	36	2	0,835	0,409
			Poumon.	26	2	0,876	3,810
non bordé.	15.	7,5	Bt antérieur du manteau.	28	2	0,853	0
2-6-49, non bordé.	16.	9,5	Bt antérieur.	43,5	2	1,182	0,177
3-6-49, non bordé.	17.	5,5	Bt antérieur.	42	2	1,389	1,070
bordé.	18.	6,5	Bt antérieur.	20	2	0,605	0,468
bordé.	19.	8,5	Bt antérieur.	29	2	0,826	0,449
bordé.	20.	8	Bt antérieur.	27,5	2	0,843	0,476

TABLEAU XIII (suite).

Date et caractéristiques	N°	Poids total g	Tissu examiné	Poids frais (P. f.) en mg	Dilution	Azote (N) dans P. f. en mg	Activité 1/25 mg N
<i>Été (Juillet)</i>							
15-7-49, bordé.	1.	10	Poumon.	30,5	$\frac{2}{4}$	0,980	3,352 (moyen).
18-7-49, bordé.	2.	8,5	Poumon.	53	3	1,187	1,446
bordé.	3.	8,5	Poumon.	19,5	2	0,647	0,861
non bordé.	4.	4,5	Poumon.	23	2	0,751	1,633
19-7-49, non bordé.	5.	5	Poumon.	22,5	2	0,658	3,219
non bordé.	6.	3,5	Poumon.	23	2	0,925	1,430
<i>Été (Septembre)</i>							
12-9-49, bordé.	1.	7,5	Btte palléale.	39	2	1,004	0,584
bordé.	2.	8	Btte palléale.	32	2	0,861	0,172
13-9-49, bordé.	3.	8,5	Btte palléale.	33	2	1,18	0,308
14-9-49, non bordé.	4.	4	Btte palléale.	32,5	2	0,737	0,484
non bordé.	5.	6,5	Btte palléale.	31	2	0,963	0,100
non bordé.	6.	5	Btte palléale.	35,5	2	0,838	0,097
15-9-49, bordé.	7.	8,5	Bt antérieur.	36	2	1,246	0,060
16-9-49, bordé.	8.	9	Bt antérieur.	48,5	2	1,500	0,252
bordé.	9.	8	Bt antérieur.	33	2	1,316	0,339
non bordé.	10.	4,5	Bt antérieur.	27	2	1,360	0
17-9-49, non bordé.	11.	5	Bt antérieur.	36	2	1,150	0,206
non bordé.	12.	4,5	Bt antérieur.	32,5	2	1,166	0
19-9-49, bordé.	13.	9	Poumon.	33	6	1,06	3,408
bordé.	14.	8	Poumon.	32	6	1,12	1,334
bordé.	15.	8	Poumon.	29	4	0,994	1,510
20-9-49, non bordé.	16.	4,5	Poumon.	25	2	1,05	1,684
non bordé.	17.	4	Poumon.	19	2	1,154	0,785
21-9-49, non bordé.	18.	5,5	Poumon.	26	2	1,055	2,408

TABLEAU XIII (suite).

Date et caractéristiques	N ^{os}	Poids total (g ²)	Tissu examiné	Poids frais (P. f.) en mg	Dilution	Azote (N) dans P. f. en mg	Activité l/25 mg N
AUTOMNE							
28-10-48.	1.	8,5	Poumon.	27,5	4	1,220	0,427
»	»	»	Bt antérieur.	23,5	4	0,820	0
29-10-48.	2.	10,5	Poumon.	54	4	1,309	1,295
»	»	»	Bt antérieur.	59,5	4	1,49	0
4-11-48.	3.	8,5	Poumon.	20	3	0,58	0,909
»	»	»	Bt antérieur.	41,5	3	1,230	0
5-11-48.	4.	11,5	Poumon.	22	3	0,776	0,939
»	»	»	Bt antérieur.	80	3	2,870	0,233
30-11-48.	5.	7,8	Bt antérieur.	27,5	3		0
8-11-48.	6.	8,5	Poumon.	31,5	3	0,812	0,302
9-11-48.	7.	8,5	Poumon.	36,5	3	0,996	0,879
10-11-48.	8.	8,5	Poumon.	33	3	0,892	1,475
»	9.	9,5	Poumon.	33	4	0,949	0,313
29-11.	10.	9,7	Poumon.	33	3	0,969	0,735
»	11.	8,5	Poumon.	24	3	0,766	3,375
					6		4,479
							5,586 (moy.)
1-12-48, bordé.	12.	8,5	Btte palléale.	53,5	4	1,52	0
2-12-48, non bordé.	13.	6	Btte palléale.	46,5	3	1,104	0,396
3-12-48, non bordé.	14.	6,5	Btte palléale.	57	3	1,392	0,261
non bordé.	15.	5,5	Btte palléale.	33	3	0,996	0,336
non bordé.	16.	5,5	Btte palléale.	47,5	3	0,822	0,666
6-12-48, non bordé.	17.	6,5	Btte palléale.	47,5	3	0,440	0,608
7-12-48, bordé.	18.	6,5	Btte palléale.	44,5	3	0,500	0
9-12-48, bordé.	19.	7,5	Btte palléale.	32	2		0
10-12-48, bordé.	20.	6,5	Btte palléale.	20	2	0,364	0,878
bordé.	21.	8	Btte palléale.	33	2,5	1,270	0

TABLEAU XIII (suite).

Date et caractéristiques	N°	Poids total g	Tissu examiné	Poids frais P. f. en mg	Dilution	Azote N dans P. f. en mg	Activité U/25 mg N
HIVER							
31-1-49, bordé.	1.	9,5	Poumon.	36	2	1,237	0,456
non bordé.	2.	5,5	Poumon.	23	2	0,693	0,621
1-2-49, bordé.	3.	6,5	Poumon.	29	2	1,05	0,555
bordé.	4.	7,5	Poumon.	40,5	3	1,26	0
non bordé.	5.	6,5	Poumon.	26,5	2	1,113	0,441
2-2-49, non bordé.	6.	6,5	Poumon.	31	2	0,858	3,399
					4		3,675 3,522 (moy.)
	7.	7	Btte palléale.	31	2	0,827	0,753
bordé.	8.	7	Btte palléale.	24,5	2	0,972	0
3-2-49, non bordé.	9.	5,5	Btte palléale.	33,5	2	»	0
non bordé.	10.	5	Btte palléale.	27,5	2	0,863	0,390
5-2-49, bordé.	11.	7	Btte palléale.	25	2	0,665	0,861
8-2-49, bordé.	12.	7,5	Btte palléale.	29,5	2	1,095	0,105
non bordé.	13.	6,5	Bt antérieur.	36	2	1,197	0,273
non bordé.	14.	5,5	Bt antérieur.	31	2	0,988	0,180
9-2-49, non bordé.	15.	5,5	Bt antérieur.	34,5	2	1,219	0,159
bordé.	16.	8,5	Bt antérieur.	42	3	1,456	0,141
bordé.	17.	7,5	Bt antérieur.	56	3	1,863	0,174
10-2-49, bordé.	18.	8,5	Bt antérieur.	36,5	2	1,113	0,366
bordé.	19.	7,5	Muscles, sous le bt antérieur.	49	3	1,825	0,330

TABLEAU XIII bis.

DOSAGES D'ANHYDRASE-CARBONIQUE DANS LE MANTEAU D'*Helix pomatia* (L.) AU PRINTEMPS

Date et caractéristiques	N ^{os}	Poids total (g)	Tissu examiné	Poids frais (P. f.) en mg	Dilution	Azote (N) dans P. f. en mg	Activité U/25 mg N
3-5-49, non bordé.	1.	20	Poumon.	58	3	1,613	1,590
	»	»	Btte palléale.	46,5	3	1,506	0,828
bordé.	2.	22	Poumon.	84,5	4	2,39	3,321
	»	»	Btte palléale.	93,5	4	2,71	0,375
5-5-49, non bordé.	3.	20	Poumon.	86	12	2,209	7,745
	»	»	Btte palléale.	68	3	1,55	0,849
6-5-49, bordé.	4.	20	Poumon.	62,5	4	1,84	1,647
	»	»	Btte palléale.	56	3	1,066	0,585
10-5-49, non bordé.	5.	18	Poumon.	59,5	4	1,765	1,416
	»	»	Btte palléale.	41	2	1,324	0,450
11-5-49, bordé.	6.	23	Poumon.	73	4	3,706	0,666
12-5-49, bordé.	7.	21	Btte palléale.	57	3	1,773	0,486
13-5-49, bordé.	8.	20	Bt antérieur.	80	4	2,438	0,830
8-6-49, non bordé.	9.	20	Bt antérieur.	51,5	3	1,323	0,733
9-6-49, non bordé.	10.	20	Bt antérieur.	78	4	2,045	1,846
non bordé.	11.	12	Bt antérieur.	64	3	1,740	0,690
10-6-49, bordé.	12.	15	Bt antérieur.	72	4	1,548	0,961
bordé.	13.	21	Bt antérieur.	49,5	3	1,273	1,910

TABLEAU XIV

RÉPARTITION DE L'ANHYDRASE-CARBONIQUE DANS LE MANTEAU DE QUELQUES MOLLUSQUES
(ÉVENTUELLEMENT DANS LA BRANCHIE)

Espèce et date de l'expérience	N ^{os}	Dimensions (en cm) et poids (g)	Tissu étudié	P. f. (mg)	Dilution	N/P. f.	Activité
<i>Ostrea edulis</i> L. 14-12-48.	1.	6,5 cm/5,5 48 g	Btte marginale du manteau (valve droite).	52	3		0
	2.	6,5/6 45 g	Btte marginale (v. gauche).	44	3		0
	3.	6,5/6 42 g	Manteau et btte marg. (v. droite).	66	3	1,480	0
	»	»	Branchie.	42,5	3	1,113	0,630
* 16-12-48. *	1.	10/11,5 134 g	Btte marg. conchylienne (v. gauche).	61,5	3		0
	»	»	Btte marg. interne (v. droite).	111	4		0
<i>Pecten maximus</i> (L.). 17-12-48.		9/11 112 g	Manteau, partie mince (v. gauche).	112	3		0
	2.	»	Branchie.	81	4	1,300	0
18-12-48.	1.	7,5/4 36 g	Manteau (v. gauche).	85	3	0,930	0,315/25 mg N., ou 0,141/g P. f.
<i>Mytilus edulis</i> (L.).	»	»	Bordure marg.	64	3	1,41	0,661/25 mg N., ou 0,585/g
		8/4,5 38	Manteau (v. droite).	258,5	4		0,045/g P. f.
22-12-48.	2		Btte marg. (v. droite).	98	3		0,569/g P. f.
25-1-49.	1.	10/4,5 cm 50 g	Manteau (v. gauche).	54	3	1,510	1,158
26-1-49.	2.	9/4,5 60 g	Bt palléal (v. gauche).	30	3		0
		9,5/4,5 88 g	Manteau (v. droite).	71	4	1,260	1,416
	3.		Bt palléal (v. gauche).	55	3	1,71	0,594
<i>Gryphea angulata</i> (Lmk). 27-1-49.		12/4,5 70 g	Manteau (v. droite).	55	3	1,30	0,918
	4.	»	Bt palléal (v. droite).	39	2	1,21	0,357
		10/4 52 g	Manteau (v. gauche).	66,5	3	1,44	0,372
28-1-49.			Bt palléal (v. gauche).	67	3	1,78	0,186
	5.		Branchies.	96	4	2,19	0,189

TABLEAU XIV (suite).

Espèce et date de l'expérience	N ^{os}	Dimensions (en cm) et poids (g)	Tissu étudié	P. f. (mg)	Dilution	N/P. f.	Activité
26-7-49. <i>Anomya ephippium</i> (L.).	1.	5/4 cm	Manteau + bt palléal des 2 valves.	65	2	1,676	0
	2.	6/5 cm	Manteau (v. gauche).	25	2	0,711	0
14-2-49. <i>Tapes decussatus</i> (L.).	1.	5,5/4 32 g	Manteau (v. droite).	38,5	2	0,760	1,117
			Bt palléal (v. droite).	85	6 12	2,256	3,825 2,946 (moy.)
15-2-49.	2.	6/4 cm 37 g	Bt palléal (v. gauche).	58,5	4 8	1,165	3,240 4,902 (moy.)
	3.	5/3,5 cm 19 g	Bt palléal (v. gauche).	78,5	5 10 15	1,836	4,572 4,209 3,825 (moy.)
17-2-49. <i>Cardium edule</i> (L.). 28-6-49.	1.	4/3 cm 13,5 g	Manteaux (v. gauche et droite).	26	2	0,601	0,779
	2.	4 g	Bts palléaux (2 valves).	23	2	0,557	1,134
22-2-49.	1.	15 g	Bt palléal.	61	2		0
	2.	10 g	Bt palléal et lobes du manteau (avec les papilles branchiales).	102	3	3,075	0,456
<i>Patella vulgata</i> (L.).	3.	15 g	Bt palléal et lobes du manteau.	96	3	2,969	1,035
	4.	15 g	Bt palléal et manteau.	106	3	3,217	1,206
	5.	15 g	Bt palléal.	63,5	2	1,790	1,536
	6.	10 g	Bt palléal.	50,5	2	1,40	1,293
1-3-49.	7.	3 exempl.	3 téguments viscéraux.	29,5	2		$k_c = 0,0104$ à 1°
1-3-49.	1.	6,5/3 cm 20 g	Manteau (v. gauche).	53,5	2	0,865	0,549
14-3-49.	2.	6/4 34 g	Manteau (v. droite).	55	4	0,606	18,165
* 16-3-49. <i>Unio pictorum</i> (L.). *	3.	6/3,5 30 g	Bt palléal (v. gauche).	56	2		0 (?)
	4.	6/3,5 20 g	Bt palléal (v. droite).	61,5	2		0 (?)
*	»	»	Manteau (v. gauche).	33	2		0 (?)
*	5.	4,5/2,5 13 g	Bt palléal des 2 valves.	84,5	3	2,216	0 (?)
	6.	5/3,2 cm 16,5 g	Manteau (v. gauche).	36,5	2	0,872	0,460

TABLEAU XIV (suite).

Espèce et date de l'expérience	N°	Dimensions (en cm) et poids	Tissu étudié	P. f. (mg)	Dilution	N/P. f.	Activité
29-6-49. <i>Unio batavus</i> (Lmk.).	1.	3,5/4,5 20 g	Bt palléal (v. gauche).	64	3	1,66	0,443
			Manteau (v. gauche).	50,5	2	0,926	2,921
30-6-49. <i>Unio</i> (species).	2.	3,5/2 7,5 g	Bt palléal (v. droite).	38	2		0 (?)
			Manteaux.	23,5	2		0 (?)
8-4-49. <i>Arca Noe</i> (L.).	1.	8/4 cm 43 g	Manteau (v. gauche).	93,5	3	1,920	0,372
	»	»	Bt palléal (v. gauche).	75,5	3	2,23	0 (?)
<i>Arca</i> * <i>Noe</i> (L.).	2.	6,2/5 12 g	Bt palléal (v. gauche).	61	2		0 (?)
1-7-49*.	3.	6,5/2,5 22 g	Manteaux.	51,5	2		0 (?)
11-6-49.	1.	2,5/1,1 cm	Manteau et bourrelet.	39	8	0,774	10,540
<i>Dreysenssia polymorpha</i> (Pall.).	2.	2,5/1 1 g 5	Bt palléal.	21,5	3	0,483	4,110
13-6-49.	3.	2,5/1,4 cm	Manteau et bourrelet.	43,5	8	0,961	7,151
	4.	2/1 cm	Bt palléal.	19,5	2	0,476	4,281
15-6-49.	1.	8,5/4,5 53 g	Manteau (v. gauche).	42,5	3	1,055	1,859
16-6-49.	2.	8/5 cm 40 g	Manteau (v. droite).	37	2	0,929	1,763
<i>Mya arenaria</i> (L.).	»	»	Région supérieure à la zone d'insertion.	116	3	3,118	0,722
17-6-49.	3.	12,5/7,5 210 g	Tégument à la base du siphon.	112	4	3,893	0,851
			Tégument à l'extrémité du siphon.	76	3	2,854	0,972
17-6-49.	1.	4,5/4,5 52 g	Manteau (v. droite).	34	2	0,952	0,336
20-6-49.	2.	4,2/4,5	Bt palléal (v. droite).	78,5	3	1,648	0,812
<i>Venus verrucosa</i> (L.).	3.	4,8/4,5 46 g	Manteaux (v. g. et dr.).	45	2	1,150	0,271
	»	»	Bt palléal (v. droite).	63	3	1,557	0,501
21-6-49.	1.	3 exempl.	Manteaux et bourrelets.	41	3	1,536	1,792
<i>Littorina littorea</i> (L.).	2.	3 exempl.	Bts palléaux.	22	2	0,788	1,726
	3.	5 exempl.	Manteaux.	31	3	1,252	0,970

TABLEAU XIV (suite).

Espèce et date de l'expérience	N ^{os}	Dimensions (en cm) et poids (g)	Tissu examiné	P. f. (mg)	Dilution	N.P. f.	Activité
22-6-49. <i>Trochocochlea crassa</i> (Pult.). 23-6-49.	1.	2 exempl.	Manteaux.	19	2	0,836	0,391
	2.	4 exempl.	Bts palléaux.	20	2	0,860	0,458
	3.	5 exempl.	Bts palléaux.	32,5	2	1,398	1,489
		»	Manteaux.	32,5	2	1,400	0,913
24-6-49. <i>Purpura lapillus</i> (L.).	1.	4 exempl.	Bts palléaux.	29	2	0,968	1,643
	2.	5 exempl.	Manteaux.	19	2	0,709	3,235
25-6-49. <i>Dosinia exoleta</i> (L.). 27-6-49.	1	4,2/4 cm 20 g	Manteau (v. gauche).	48	3	1,260	0,557
	2.	4/4,5 22 g	Bt palléal (v. gauche).	40	2	1,239	0,413
	3.	3,3/3,5 13,5 g	Manteau (v. dr. et siphon).	58,5	3	1,786	0,337
	4.	4/4 19 g	Manteau (v. dr. sans le siphon).	34	2		0 (?)
28-6-49. *	5.	4,2/4 18 g	Bt palléal (v. gauche).	35	2		0 (?)
4-7-49. <i>Anodonta cygnea</i> (L.).	1.	10/4 cm 68 g	Bt palléal (v. droite).	55	3	0,935	1,311
		»	Manteau (v. droite).	57	3	0,474	0,894
5-7-49.	2.	10,4 cm 64 g	Manteau (v. gauche).	122	3	0,610	2,800
		»	Bt palléal (v. gauche).	103	3	2,022	0,165
11-7-49.	3.	9,5/4 cm 62 g	Bt palléal (v. droite).	68	3	1,561	0,264
6-7-49. <i>Sphaerium corneum</i> (L.). 8-7-49.	1.	4 exempl.	Bts palléaux.	39,5	2	1,092	0,260
	2.	2 exempl.	Manteau et bourrelet.	32,5	2	0,753	1,008
	3.	4 exempl.	Manteau et bourrelet.	48,5	2	1,056	0,359
12-7-49. <i>Paludina vivipara</i> (Lmk.).	1.	6 g	Bt palléal et manteau.	21,5	2	0,258	0,777
	2.	5,5 g	Manteau.	21,5	2	0,586	0
	3.	4,5 g	Bt palléal.	26,5	2		0
15-7-49.	4.	2,5 g	Manteau.	19	2	(0,520)	1,529

Remarque : (Les dosages des n° 1, 2, 3 de *Paludina vivipara* ont été effectués sur des adultes dont la cavité incubatrice renfermait des petites paludines (Cf. le texte).

TROISIÈME PARTIE

ESSAI SUR LE MÉCANISME DE FORMATION
DE L'ARAGONITE DES COQUILLES

L'étude qui vient d'être effectuée laisse encore en suspens quelques questions, à vrai dire accessoires : on peut se demander pourquoi les prodissoconques de nombreux Mollusques sont calcitiques, alors que les coquilles des animaux adultes sont aragonitiques; pourquoi les régénérats des *Helix* forment d'abord de la calcite ou un mélange de calcite et d'aragonite en proportions variées, puis de l'aragonite; pourquoi, enfin, il y a une trace de calcite dans les dépôts d'aragonite ?

Il n'est pas possible actuellement de répondre à ces trois questions.

Mais, de toutes façons, la question principale est de savoir comment l'anhydrase agit sur le bicarbonate de calcium pour orienter la précipitation du CO_2Ca vers l'aragonite ? Si l'on s'en rapportait aux expériences de VETTER déjà citées, on pourrait croire qu'elle agit en accélérant le départ du CO_2 des solutions de bicarbonate de calcium. Malheureusement, les expériences de VETTER ne sont pas concluantes. En effet, cet auteur prétend avoir obtenu « même de la vaterite » en accélérant, par un courant d'azote, le départ du CO_2 d'une solution de bicarbonate de calcium dans l'eau de mer ? Il aurait d'abord fallu opérer dans l'eau ordinaire. D'ailleurs, PRENANT n'a pu confirmer ces résultats.

Il était donc indispensable de reprendre les expériences de VETTER, sous deux formes différentes : 1° avec des solutions minérales pures; 2° avec des solutions minérales en présence d'anhydrase.

1. — La vitesse de départ du CO_2 d'une solution de bicarbonate de calcium influence-t-elle la forme minéralogique du calcaire déposé ?

J'ai d'abord fait passer un courant d'azote dans des solutions de $(\text{CO}_3\text{H})^2\text{Ca}$, soit lentement (120 bulles à la minute), soit rapidement, à la pression maximum. J'opérai sur des solutions de bicarbonate pur ou mélangé de phosphate monocalcique en quantité variable (on se rapproche ainsi des conditions naturelles), enfin sur des solutions d'eau de mer riches en bicarbonate de calcium. Il suffit, pour caractériser une solution de ce type, d'en connaître le pH et le CO_2 total ou l'alcalinité, comme FRANQUIN et MARÉCAUX [235] l'ont montré. Pour évaluer le CO_2 total, j'ai employé l'appareil que représente la figure 32.

La substance à analyser est décomposée dans le ballon à réaction par de l'acide sulfurique. Le CO_2 libéré est entraîné, par chauffage d'abord, puis par un courant d'air préalablement débarrassé de son CO_2 , dans les tubes absorbeurs 1 et 2 qui contiennent de l'ascarite. Le courant

d'air débite à 3 litres-heure; le dosage s'effectue en calculant la différence de poids des absorbeurs, avant et après l'expérience.

Quant au Ca, j'en ai effectué le dosage par titrimétrie à l'oxalate de calcium (Cf. G. CHARLOT et D. BÉZIER : Méthodes modernes d'analyse quantitative minérale, 1945).

En aucun cas, je n'ai obtenu de l'aragonite ou de la vaterite. Quand on chasse le CO_2 des solutions par un courant d'azote à grand débit, on observe, dans les précipités, des sphérolithes qu'un examen superficiel pourrait faire prendre pour de la vaterite; mais

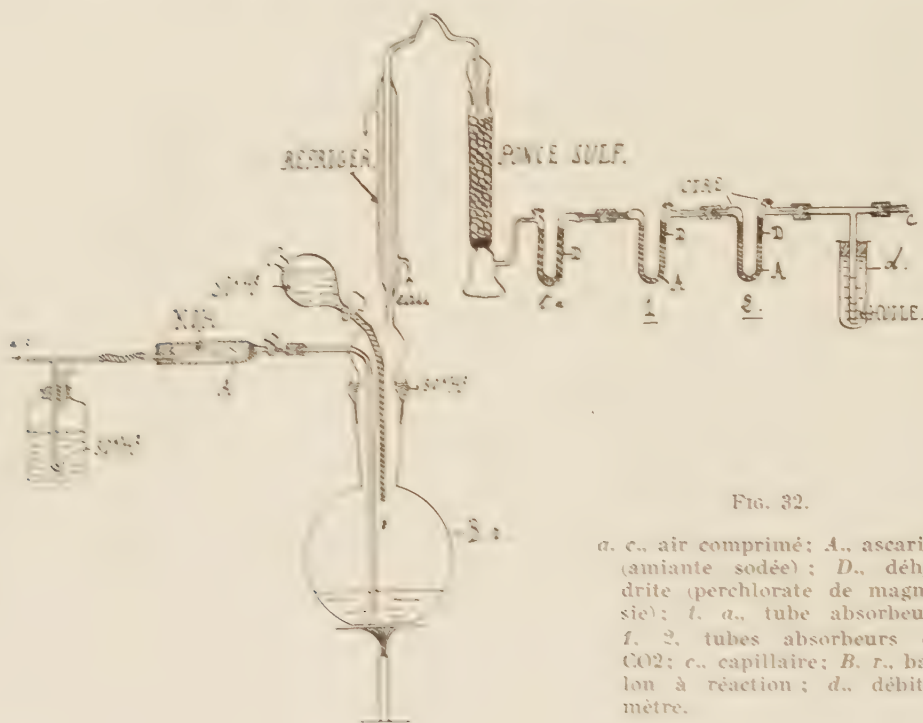


FIG. 32.

a. c., air comprimé; A., ascarite (amiante sodée); D., déhydrite (perchlorate de magnésie); t. a., tube absorbeur; t. 2, tubes absorbeurs de CO_2 ; c., capillaire; B. r., ballon à réaction; d., débitomètre.

les spectres de rayons X montrent que c'est de la calcite. Quand il y a, dans la solution, une quantité suffisante de phosphate monocalcique, le précipité est amorphe, bien entendu.

Le tableau xv contient quelques-uns des résultats que j'ai obtenus.

J'ai cherché à opérer à des pH plus alcalins. Pour cela, j'ai ajouté du carbonate d'ammonium à des solutions de $(\text{CO}_3\text{H})_2\text{Ca}$ avec ou sans phosphate monocalcique.

Si l'on fait passer un courant d'azote à grande vitesse dans une solution de pH = 8,7 qui contient : 75 cm³ d'une solution de $(\text{CO}_3\text{H})_2\text{Ca}$, dont le pH est de 7,35 et la teneur en CO_2 total de 0,300 g/litre, et une trace de $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$, on obtient encore de la calcite.

Si l'on mélange à la solution de bicarbonate de calcium de pH: 7,35, 3 cm³ de $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ et à cm³ de phosphate monocalcique $\frac{N}{10}$, il se forme un précipité d'apparence gélatineuse; que l'on y fasse passer ou non de l'azote, on obtient de la calcite (le pH du mélange est de 12,5).

Il est également possible d'accélérer le départ du CO_2 à l'aide des ultra-sons. Je l'ai essayé. Mais je n'insisterai pas sur la description des appareils que j'ai utilisés et sur les

précautions que j'ai dû prendre pour éviter l'échauffement des liquides, car de toutes façons je n'ai obtenu que de la calcite. Quelle que soit la valeur des énergies ultrasoniques que l'on emploie, on accélère en effet le départ du CO_2 , mais en même temps on secoue considérablement les molécules et l'on recueille toujours la forme cristalline stable.

TABLEAU XV

SOLUTION 1 : Bicarbonate de calcium pur (saturé en CO_2).

CO_2 total.	pH	Teneur en (Ca^{++}) .	Précipités obtenus en chassant CO_2 par l'azote à des vitesses variables.
1,066 g/l.	6,80	353,6 mg l.	Calcite.

SOLUTION 2 : Eau de mer saturée en CO_2 et riche en bicarbonate de calcium.

CO_2 total.	pH	Précipités obtenus sous l'effet d'un courant d'azote.
0,850 g/l.	7,275	Calcite.

SOLUTION 3 : 100 cm^3 de la solution (1) et 5 cm^3 de phosphate monocalcique : $\frac{\text{N}}{25}$

pH = 6,85. Action d'un courant d'azote →
Calcite.

SOLUTION 4.

100 cm^3 solution (1) et 15 cm^3 phosphate monocalcique $\frac{\text{N}}{25}$.

pH = 6,55. Action de l'azote →
Précipité amorphe.

2. — Action de l'anhydrase-carbonique, « in vitro », sur quelques solutions minérales.

J'ai d'abord utilisé de l'anhydrase-carbonique en poudre dont je plaçai des quantités croissantes dans 20 cm^3 d'une solution de $(\text{CO}_3\text{H})_2\text{Ca}$. Je laissai l'ensemble à la température ordinaire. Je n'ai obtenu que de la calcite. Mais, en abandonnant les mélanges au frigidaire, vers 5°, on observe au fond des coupelles, 24 à 48 heures après, de très grands cristaux en forme de croix. Ces cristaux, dont la figure 33 représente la partie centrale, peuvent avoir des longueurs de 2, 3, 4 et 5 mm. A la surface de la solution, on remarque une pellicule formée de petits amas cristallins où l'on distingue des sphérolithes imparfaits. Examinée aux rayons X, cette pellicule se montre constituée par de la calcite, de la vaterite et une autre variété de calcaire qu'il ne me fut pas possible d'identifier sur le champ. Cependant, parmi les cristaux du fond, on peut détecter des formations d'apparence monoclinique, de sorte que l'on est conduit à penser à l'hexahydrate de CO_3Ca qui appartient à ce système cristallin. Si l'on place quelques minutes les cristaux en croix

dans une étuve à 90°, on s'aperçoit, par l'étude aux rayons X, que l'on est en présence d'un mélange de vatérite et de calcite. D'autre part, les cristaux abandonnés à la température ordinaire dans de l'eau distillée disparaissent à peu près complètement en huit jours, ce qui prouve leur grande solubilité. Mais tous ces caractères sont ceux que VETTER [268, 2°] avait décrits pour identifier le $\text{CO}_3\text{Ca} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1). VETTER avait d'ailleurs remarqué, par l'examen au microscope polarisant, que l'hexahydrate peut évoluer en vatérite et en calcite.

L'étude aux rayons X de la poudre d'hexahydrate fournit enfin la liste des d caractéristiques de ce cristal. Cette liste n'était pas connue; elle ne figure pas dans l'index international, c'est pourquoi il m'a paru nécessaire de la donner (Cf. tableau XVI).



FIG. 33.

Il est clair que le $\text{CO}_3\text{Ca} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ne se confond pas avec les autres variétés de carbonate de calcium.

Malheureusement, ces résultats n'apportaient aucun élément nouveau au problème étudié. D'ailleurs, VETTER avait montré que la sursaturation en bicarbonate de Ca, la présence de matière organique (la poudre d'anhydrase ici) et le froid étaient des facteurs favorables à la cristallisation du $\text{CO}_3\text{Ca} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Les mêmes expériences effectuées avec des solutions d'anhydrase-carbonique au chloroforme, actives ou inactivées par chauffage, ne donnent encore que de la calcite. On remarque seulement que les cristaux formés en présence d'une solution active sont plus petits que ceux qui se forment avec la solution inactive; cette différence provient évidemment de l'action de la diastase sur la vitesse de dégagement du CO_2 .

(1) On ne connaissait pas l'hexahydrate sous l'aspect que représente la figure 33.

TABLEAU XVI

N°	Intensité	d	N°	Intensité	d
1.	m.	5,89	16.	f.	2,20
2.	T. F.	5,21	17.	f.	2,18
3.	f.	4,50	18.	t. f.	2,09
4.	F.	4,17	19.	m.	2,06
5.	f.	3,99	20.	m.	2,00
6.	m.	3,49	21.	f.	1,95
7.	m.	2,93	22.	m.	1,93
8.	F.	2,78	23.	f.	1,90
9.	f.	2,77	24.	m.	1,84
10.	m.	2,68	25.	t. f.	1,79
11.	m.	2,66	26.	m.	1,72
12.	f.	2,62	27.	f.	1,59
13.	m.	2,58	28.	f.	1,55
14.	t. f.	2,31	29.	t. f.	1,47
15.	F.	2,24			

Enfin, je mélangeai de l'anhydrase-carbonique en solution aqueuse, obtenue après la purification de KEILIN et MANN (méthode B), à des solutions de bicarbonate de calcium, pur ou mêlé de phosphate monocalcique $\frac{N}{50}$. J'opérai en général sur de faibles quantités : 5 à 7 cm³, pour ne pas avoir à diluer outre mesure les solutions d'anhydrase-carbonique dont je disposai. La figure 31 montre en effet que, jusqu'à la dilution 1/100, si l'on part de solutions dont l'activité est de 121 U/cm³, les valeurs de K varient peu; il pouvait donc être utile de se placer dans cette zone. Les précipités obtenus fournissent juste assez de matière pour l'examen aux rayons X. Dans des coupelles de verre identiques, je versai 4 ou 5 cm³ de (CO₂H)²Ca à saturation; puis 0,5 cm³ de phosphate monocalcique $\frac{N}{50}$, ou de « phospho-carbonate » (selon BARILLÉ, 227), préparé en faisant passer un courant de CO₂ dans un mélange de CO₂Ca et de phosphate bicalcique en solution aqueuse; enfin 0,5 ou 1 cm³ de la solution d'anhydrase diluée de 10 à 1 000 fois.

Je n'ai obtenu que de la calcite ou du calcaire amorphe (en présence d'une quantité suffisante de (PO₄)²CaH₄). Une solution de 4 cm³ de bicarbonate de calcium à saturation, avec 0,5 cm³ de phosphate monocalcique $\frac{N}{50}$, 0,5 cm³ de liquide extrapalléal de Moule et 1/2 cm³ d'anhydrase à 121 U/cm³, abandonnée à la température de la pièce, laisse déposer, avec la calcite, du NaCl qui provient évidemment du liquide extrapalléal.

J'ai essayé de faire agir l'enzyme sur du bicarbonate de calcium « naissant » (1). J'ai, pour cela, repris sous une autre forme l'expérience de MELDRUM et ROUGHTON (*loc. cit.*) : on prépare un mélange de CO₃(NH₄)² et de carbamate en équilibre en faisant passer un courant de CO₂ dans une solution d'ammoniaque. On agite 10 cm³ de cette solution avec 10 cm₃ d'une suspension de SO₄Ca, et 1 cm³ d'anhydrase à $\frac{121}{10}$ U/cm³. Il se forme, par double décomposition, du CO₃Ca que l'on isole. Puis on laisse le carbamate de calcium, qui est resté en solution, se décomposer et l'on recueille le nouveau précipité de calcaire formé en présence d'anhydrase. Les deux précipités sont faits de calcite.

(1) J'emploie ce terme sans préjuger des propriétés chimiques du produit envisagé, qui, au moment où il se forme, serait peut-être, comme tous les composés à cet état, et selon certains auteurs, doué d'une plus grande « réactivité ».

3. — Discussion.

Il n'a donc pas été possible d'obtenir de l'aragonite à froid. Mais quelles conclusions peut-on tirer des expériences qui précèdent ?

D'abord, il semble bien que l'on ne puisse pas modifier la forme minéralogique du calcaire déposé en accélérant la vitesse de sa formation à la température ordinaire. L'anhydrase-carbonique n'agit donc pas de cette manière.

Mais alors il ne reste plus qu'une possibilité à examiner. Elle se rapporte à une propriété générale des enzymes, qui s'applique par conséquent à l'anhydrase-carbonique : *comme tous les enzymes*, l'anhydrase-carbonique se combine au substrat sur lequel elle agit ; elle manifeste d'autre part son activité en accélérant le départ du CO_2 des solutions de bicarbonate de calcium. C'est donc dans l'étude des modalités de la combinaison de l'enzyme et du substrat que l'on peut espérer trouver une explication à la formation de l'aragonite.

Il semblerait, en fonction de cette affirmation, qu'il suffise de mettre en présence de l'anhydrase et du bicarbonate de calcium pour obtenir de l'aragonite ? Or, les expériences effectuées à ce sujet (Cf. III^e partie [2^e]) ont été négatives. Il ne serait pas justifié cependant d'en conclure que l'anhydrase est étrangère à la formation de l'aragonite, car ces expériences ont été effectuées dans des conditions grossièrement différentes de celles qui existent dans la nature. Il est évident que nous ne sommes pas en mesure de reconstituer exactement le milieu dans lequel la molécule d'enzyme évolue lors de la formation de la coquille, alors que le milieu a une influence prépondérante, comme nous l'avons vu, sur l'activité de l'anhydrase, aussi bien que sur celle de toutes les diastases (1). Il reste donc permis, jusqu'à nouvel ordre, de croire à l'intervention de l'anhydrase-carbonique. Sinon, comment pourrait-on justifier qu'à trois reprises différentes, dans le cadre de cette hypothèse, on ait pu prévoir l'existence de phénomènes tels que l'inhibition de l'anhydrase-carbonique par l'eau de mer, la non-inhibition du même enzyme par le liquide extrapalléal des Mollusques et la possibilité pour la molécule d'anhydrase elle-même de se transformer ? Il ne peut s'agir d'une triple coïncidence. Il faut donc rechercher, dans les modalités de la combinaison de l'enzyme et du substrat, l'explication du mécanisme de la formation de l'aragonite.

Dans cet ordre d'idées, on peut envisager deux variantes du phénomène : 1° lors de la combinaison entre le bicarbonate et la diastase, les atomes du bicarbonate sont disposés de telle manière qu'après le départ du CO_2 , ils dessinent dans l'espace la maille orthorhombique pseudo-hexagonale qui caractérise l'aragonite. 2° La position des atomes de C, O, Ca, dans les mêmes circonstances, n'est pas *exactement* celle qu'ils occupent dans l'aragonite, mais elle en est voisine. Dans ces conditions, lors de la cristallisation, les forces d'attraction (de la nature desquelles nous ne préjugeons pas), qui s'exercent entre eux, les amèneront à regagner une position d'équilibre qui sera, puisqu'elle est la plus voisine de la position de départ, celle des atomes dans les cristaux d'aragonite.

Nous avons vu d'autre part que l'anhydrase n'est pas inhibée complètement par l'eau de mer, plus précisément par le chlorure de sodium. Elle continue donc, en présence de NaCl, à accélérer un peu la dissociation du $(\text{CO}_3\text{H})^2\text{Ca}$, et par conséquent il faut bien

(1) STOLKOWSKI (J.) : *Les diastases*. Collection « Que sais-je ? », 1950.

admettre que la diastase continue à se combiner au substrat, vraisemblablement par l'intermédiaire de ceux des groupes actifs qui ne sont pas bloqués par l'inhibiteur. Dans ces conditions, on obtient de la calcite, dont le dépôt est alors plus rapide qu'en l'absence de diastase.

S'il n'existe qu'une variété d'anhydrase, nous en arrivons à expliquer la formation d'aragonite ou de calcite par l'action des effecteurs (inhibiteurs de l'eau de mer, activateur du liquide extra-palléal...), qui ne laissent libres qu'un nombre variable de groupes actifs dont la disposition spatiale est le facteur déterminant du phénomène. Mais cette conception se heurte à une constatation expérimentale : la formation simultanée, dans un même milieu, d'aragonite et de calcite, lors de la régénération des coquilles chez *Helix aspersa* ? Il faut bien se rappeler, puisqu'il en est ainsi, que, parmi les hypothèses susceptibles d'expliquer l'augmentation du coefficient d'absorption dans l'ultra-violet des solutions d'anhydrase en fonction de la dilution, figure l'existence de deux ou plusieurs formes de l'enzyme susceptibles de se transformer les unes dans les autres, certaines formes prédominant à des dilutions déterminées. Si l'on se limite à deux formes pour simplifier, il n'est pas illogique de penser, sans prétendre choisir définitivement, qu'il peut y avoir une forme d'anhydrase-carbonique (*A. C. calc.*) susceptible d'orienter la cristallisation du calcaire vers la calcite, et une autre forme (*A. C. arag.*) susceptible de l'orienter vers l'aragonite, abstraction faite du rôle des effecteurs.

Il serait souhaitable que l'on puisse confronter les structures de l'anhydrase d'une part, de l'aragonite et de la calcite d'autre part. En principe, elles devraient pouvoir « s'encastrent » l'une dans l'autre, comme les deux parties d'une queue d'aronde. Malheureusement, les schémas des structures de l'aragonite et de la calcite, tels que WYCKOFF [40] les a proposés, ne correspondent qu'à une interprétation, et surtout on sait peu de choses de la composition de l'anhydrase, à plus forte raison de la disposition dans l'espace de ses groupes actifs. Il faudra attendre, pour reprendre cette question, que nos connaissances cristallographiques se soient enrichies.

En somme, dans le cadre de la dernière interprétation, nous en arrivons à penser que c'est en modifiant l'aspect superficiel de la molécule d'anhydrase que l'eau de mer d'une part, le liquide extra-palléal de l'autre, agissent. Or, cette action qualitative a été découverte par un raisonnement quantitatif. Il est vrai que l'inhibition ou l'activation de l'anhydrase ne sont que la manifestation des phénomènes qui se déroulent au niveau de la molécule, et le physiologiste n'a pas actuellement d'autres moyens que quantitatifs de les détecter. Mais il y a évidemment une heureuse coïncidence entre la non-inhibition de l'anhydrase par les effecteurs et la présence de l'aragonite.

On doit aussi se demander s'il est possible, pour expliquer la formation de l'aragonite, de faire appel à un autre processus qu'à une intervention diastasique ? BRUNI et THROMBARA, nous l'avons vu, avaient songé à l'influence des « protéines ». D'autres avaient fait de même, bien avant eux d'ailleurs. PRENANT (*loc. cit.*) avait déjà discuté du rôle possible des protéines dans la stabilisation du calcaire amorphe, parce que BUTSCHLI en avait émis l'idée. PRENANT a démontré que cette idée n'avait pas de fondement réel. G. RANSON a aussi pensé, et pense encore, que les protéines des coquilles peuvent être la cause de la différenciation du calcaire en aragonite et en calcite. J. ROCHE et EYSSERIC-LAFON, à l'obligeance de qui je dois les renseignements (inédits) qui suivent, ont même fait quelques analyses de protéines, dans la couche nacrée d'une part, la couche prismatique d'autre part, sur quelques espèces où la séparation de ces deux parties est facile à

effectuer. Chez *Meleagrina margaritifera*, notamment, ils ont pu mettre en évidence l'existence d'un assez grand nombre d'acides aminés dont les teneurs dans l'une et l'autre couche ne sont pas toujours comparables. On trouve par exemple, pour trois acides aminés seulement, les teneurs suivantes, en % :

	Nacre	Couche des prismes
Glycocolle.....	14,92	20,55
Arginine.....	6,45	4,80
Tyrosine.....	2,87	15,30

Les protéines des deux couches sont différentes. Mais il faudrait connaître, pour tirer des conclusions valables de ces analyses, la composition de chacune des deux protéines qui forment la matière organique de la couche prismatique, ce dont les résultats qui viennent d'être exposés ne tiennent pas compte. La séparation de ces deux parties (substratum et fourreau des prismes) ne semble pas réalisable, mais on pourrait avoir une idée de la composition du fourreau en analysant le periostracum, à condition de pouvoir s'en procurer, ce qui n'est pas toujours facile. D'ailleurs, M. le Professeur JEAN ROCHE a bien voulu me confier qu'il doutait fortement de la validité du rôle des protéines, depuis qu'il avait rencontré des formations calcaires très puissantes dans lesquelles il y avait peu de matière organique.

Mais il est intéressant de constater que si l'on cherche à expliquer les observations qui sont relatées dans les I^{re} et II^e parties, on est conduit à attribuer aux protéines (dont il resterait d'ailleurs à préciser la nature), des propriétés qui sont celles de l'anhydrase-carbonique. Comment justifier, par exemple, la présence simultanée de calcite et d'aragonite dans la nacre de certaines coquilles, sans imaginer que les cellules épithéliales du manteau sécrètent un mélange de protéines « à calcite » et de protéines « à aragonite » ? Admettra-t-on également que le milieu agit sur ces protéines quand l'eau de mer pénètre entre le manteau et la coquille ? Cela est indispensable si l'on veut expliquer, chez la Moule notamment, qu'une partie du manteau, celle qui est située entre le sillon palléal et l'insertion du manteau sur la coquille, forme de la calcite, alors que le reste de ce même manteau forme de l'aragonite ? Nous pouvons donc supposer que, dénaturées par l'eau de mer, les « protéines aragonitiques » deviendront des « protéines calcitiques » ; ou que la calcite se déposera seule, par suite de l'action de l'eau de mer sur la protéine capable d'agir sur ce bicarbonate pour le faire cristalliser sous forme d'aragonite.

D'autre part, pour expliquer le mécanisme de l'opération, on doit concevoir que les atomes du bicarbonate de calcium sont « orientés » par les protéines. Mais comment pourrait-on justifier cette orientation sans affirmer qu'il y a entre les protéines et le bicarbonate une « combinaison » ? Certes, on a montré que les *cristaux* de CO_3Ca peuvent être « orientés » par les protéines qui les accompagnent dans une direction déterminée. Mais il faudrait prouver que cette action, de surface en somme, peut être plus intime, et peut influencer sur la nature même des cristaux avant leur formation ? Rien ne permet de l'affirmer.

Il est donc superflu de substituer une théorie sans fondement expérimental à une théorie qui s'appuie sur des résultats expérimentaux.

Sans doute, cette dernière théorie n'a pas tout expliqué. Mais la principale incertitude qui demeure, touchant le mécanisme d'action de l'anhydrase, rejoint le mystère qui entoure pour nous les réactions chimiques en général et les actions diastasiques en particulier.

Il pourrait être intéressant de rechercher, suivant les mêmes principes, les conditions

de cristallisation du calcaire chez les *Brachiopodes* et les *Cirripèdes*, puisque les formations calcifiées (calcitiques) de ces animaux proviennent de la décomposition du bicarbonate de calcium; et aussi chez les polypiers d'*Hexacoralliaires* et d'*Hydrocoralliaires*, dans la mesure où la formation de leurs dépôts calcaires relève d'un processus analogue à celui des Mollusques.

Mais, d'une manière générale, partout où de l'anhydrase-carbonique est libérée dans un milieu qui contient du bicarbonate de calcium, ou des produits susceptibles, en se décomposant, de former du bicarbonate de calcium, on peut s'attendre à trouver de l'aragonite, si les conditions de milieu permettent à l'enzyme d'agir.

C'est une explication de ce genre qu'il faut donner à la formation des perles, qui sont en aragonite, et qui se développent à l'abri de l'eau de mer, dans l'épaisseur du manteau. On doit aussi rapprocher de ces phénomènes la formation des otolithes, dont beaucoup sont aragonitiques : une étude semblable à celle qui vient d'être faite serait certainement fructueuse dans ce domaine.

Il convient enfin de préciser qu'on ne saurait préjuger de l'influence de l'anhydrase-carbonique sur les dépôts de calcaire intracellulaires, qu'ils soient faits de calcite, de calcaire amorphe ou de vaterite. C'est un autre aspect des questions de calcification que les recherches futures devront aborder.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION

Le problème du déterminisme des formes minéralogiques du calcaire pose, chez les êtres vivants, la question du balancement entre l'aragonite et la calcite; c'est à l'étude de cette question, chez les Mollusques spécialement, que ce travail a été consacré.

Je me suis d'abord efforcé de reviser les données du problème. J'ai montré, à cette occasion, que la réaction classique de MEIGEN au nitrate de cobalt était surtout due à un phénomène d'adsorption. J'ai déterminé, à l'aide des rayons X, la composition minéralogique précise d'un certain nombre de coquilles : ces déterminations montraient déjà l'extrême complexité du problème; aucun facteur chimique ou physico-chimique ne pouvant en rendre compte, il ne restait plus qu'à en attribuer l'origine à l'intervention d'un facteur biologique. On devait songer à l'anhydrase-carbonique, dont la découverte était relativement récente et dont l'action n'avait pas été étudiée de ce point de vue.

Abordant le fond du problème, j'ai montré que l'anhydrase-carbonique doit jouer un rôle. L'argumentation qui nous permet de l'affirmer repose sur un ensemble d'expériences et d'observations.

Une première série d'expériences mit en évidence la possibilité d'intervention de l'enzyme dans les phénomènes qui aboutissent à la formation des coquilles : d'une part, on peut inhiber la régénération de la coquille chez les Escargots que l'on traite par le benzène-sulfamide (inhibiteur partiel de l'anhydrase); d'autre part, le dosage de la diastase dans le manteau des *Helix*, en fonction de la saison, montre un net accroissement d'activité au printemps, lors de la poussée coquillière et du réveil des fonctions de tout l'animal.

Une dernière série d'expériences allait permettre de relier la présence de l'anhydrase

à la formation de l'aragonite. En effet, si l'on étudie la distribution de l'enzyme dans le manteau des Mollusques, on constate qu'il existe deux catégories d'animaux à coquille calcitique : l'une dont le manteau ne possède pas d'anhydrase (*Ostrea edulis*, par ex.), l'autre (*Gryphea angulata*, notamment) qui en possède. Mais, dans cette dernière catégorie, on remarque que tous les tissus palléaux qui forment de la calcite baignent dans le milieu marin environnant. C'est le cas pour le bourrelet palléal de *Mytilus edulis* et le manteau de *Gryphea angulata*. Si l'on admet que la calcite se forme en l'absence d'anhydrase, on est conduit à penser que l'eau de mer doit inhiber la diastase libérée par les cellules épithéliales du manteau lors de la poussée coquillière. L'expérience prouve que cela est exact. C'est le chlorure de sodium qu'elle contient qui donne son pouvoir inhibiteur à l'eau de mer.

D'autre part, on sait qu'il existe dans le sang des Lamellibranches marins autant de NaCl que dans l'eau de mer. Le liquide extrapalléal de ces Mollusques, qui provient du sang, humecte toujours la surface du manteau; par conséquent, on pouvait s'étonner de trouver, chez des animaux comme *Mytilus edulis*, une nacre aragonitique, puisque l'anhydrase libérée lors de la croissance en épaisseur de la coquille devrait être inhibée ? Il fallait donc nécessairement étudier l'action du liquide extrapalléal des Lamellibranches marins sur l'anhydrase-carbonique. Cette étude, effectuée sur *Mytilus edulis*, montre non seulement que l'enzyme n'est pas inhibé au sein du liquide extrapalléal, mais encore qu'il y est considérablement activé. Le liquide extrapalléal de l'Anodonte a les mêmes propriétés.

L'expérience prouve, par ailleurs, que le *periostracum* de *Mytilus edulis* est perméable. On s'explique alors que l'eau de mer puisse agir sur le bourrelet palléal.

Ces résultats, qui donnaient une consécration expérimentale à l'hypothèse de départ, n'étaient pas entièrement satisfaisants : des anomalies s'étaient révélées au cours des dosages d'anhydrase, et de plus certains Mollusques, dont le manteau semble baigné par l'eau de mer, ont une coquille aragonitique.

Ces observations indiquaient l'existence de phénomènes complexes. Pour savoir s'il était possible de les relier à quelque propriété de la molécule d'anhydrase, j'ai étudié le spectre d'absorption de cet enzyme dans l'ultra-violet. On constate que le coefficient d'absorption varie avec la dilution. Il y a donc une transformation possible de la molécule d'anhydrase. Cette transformation, sur la nature exacte de laquelle on ne peut encore émettre que des hypothèses, prouve en tous cas, puisque les phénomènes observés *in vitro* peuvent toujours se retrouver *in vivo*, que des cellules différentes pourront produire de l'anhydrase sous des aspects différents. Et c'est dans le cadre de cette affirmation, en rapport avec le mode d'action de l'enzyme sur les produits qui forment les coquilles, que l'on peut espérer fournir un jour une réponse à toutes les questions qui restent posées.

Les essais *in vitro* ne m'ont pas permis cependant d'obtenir de l'aragonite. On ne saurait s'en étonner, étant donné la complexité des milieux naturels dans lesquels la diastase évolue. Mais on peut constater que l'on ne change pas la forme minéralogique du calcaire déposé en accélérant la vitesse de la réaction qui lui donne naissance. Il y a donc autre chose : un facteur qui agit sur l'orientation des atomes du bicarbonate de calcium, de telle sorte qu'il se dépose, après le départ du CO_2 , soit des cristaux d'aragonite, soit des cristaux de calcite. Il est logique de penser que cette orientation se produit dans une région spatiale où il y a une liaison entre l'enzyme et le substrat, et que la forme miné-

ralogique doit dépendre des modalités de cette liaison, modalités qui seraient à préciser dans l'avenir. Dans cet ordre d'idées, il faut tenir compte de la multiplicité possible des anhydrases : il se pourrait que telle forme oriente les atomes d'une façon, telle autre forme d'une autre façon.

Il reste démontré que l'anhydrase-carbonique a une influence très importante sur le déterminisme des formes minéralogiques du calcaire dans les coquilles de Mollusques.

BIBLIOGRAPHIE

MINÉRALOGIE

1. BAAS (L. G. M.), BECKING, GALLICHER (E. W.). — Calcite. *J. Physic. Chem.*, 35, 1931, pp. 467-479.
2. BEARDEN (J. A.). — Calcite. *Physic. Rev.*, 38, 1931, pp. 1389-1891 et 2089-2098.
3. BHAGAVANTAM (S.). — Raman Effect in Calcite and Aragonite. *Zeitschr. f. Kristall.*, 77, 1930, pp. 43-47.
4. BRANDENBERGER (E.) et SCHINZ (H. R.). — *Helvetica Medica Acta*. Suppl. XVI, v. 12, 1945.
5. BRANDENBERGER (E.) et SCHINZ (H. R.) — La nature de la substance minérale de l'os. *Experientia*, 4, 1948, pp. 59-60.
6. BRASSEUR (H.). — Sur les propriétés optiques des carbonates. *Zeitschr. f. Kristall.*, 83, 1932, p. 493.
7. BRASSEUR (P.). — Sur la constitution minérale de l'os. *Bull. Soc. Franç. Min.*, LXX, 1947, pp. 11-12.
8. BRASSEUR (H.), DALLEMAGNE (M. J.) et MELON (J.). — La nature de la substance minérale de l'os. *Experientia*, v. IV, fasc. 11, 1948.
9. BRINDLEY (G. W.). — *Phil. Mag.*, 36, 1945.
10. COLBY (M. Y.) et LACOSTE (L. J. B.). — The crystal Structure of witherite. *Zeitschr. f. Minér.*, 90, 1934, 1-7.
11. COOKSEY (C. D.) et COOKSEY (D.). — Calcite. *Nature*, 125, 1930, p. 461.
12. COX (E. G.) et GOODWIN (T. H.). — The quantitative analysis of calcite-aragonite mixtures by x-rays. *J. Soc. Chem. Ind.*, 52, 1933, p. 172.
13. FAIVRE (R.) et CHAUDRON (G.). — *Bull. Soc. Chim. France*, 5^e sér., 11, 1944, p. 387. *C. R. Ac. Sc.*, 219, 1944, p. 29.
14. FAIVRE (R.). — Recherche des conditions physico-chimiques de précipitation des 3 formes cristallines du carbonate de calcium préparé par double décomposition du chlorure de calcium et du carbonate de sodium. 1^o *C. R. Ac. Sc.* 222, 1946, pp. 140-141; 2^o *Ibid.*, 219, 1944, p. 73; 3^o *Ibid.*, *Métaux et corrosion* (fév. 1947), pp. 21-27.
- 14 bis. FAIVRE (R.) et WALLAEYS (R.). — Sur les transformations de vaterite naissante au contact de sa liqueur mère. *C. R. Ac. Sc.*, 231, 1950, pp. 285-287.
15. FAVEJEE (J. CH. Z.). — Quantitative röntgenographische Bodenuntersuchung. *Zeitsch. f. Krist.*, 101, 1939, pp. 259-270.
16. FUKUSHIMA (H.). — Calcite. *J. Sci. Hiroshima Univ.*, A. I., 1932, pp. 195-201.
17. GARRIDO (J.) et BLANCO (J.). — Structure cristalline des piquants d'Oursin. *C. R. Ac. Sc.*, 224, 1947, p. 485.
18. GAY (ROBERT). — Etude des phénomènes de précipitation par une méthode de diffusion. Applications minéralogiques. *Thèse Paris*, 1944.
19. GLISZCZYNSKI (S. VON) et STOICOVICI (E.). — *Zeitsch. f. Kristall.*, 98, 1937, pp. 344-350.
20. HEIDE (F.). — Ueber den Vaterit. *Centralblatt f. Min.*, 1924, pp. 641-651.

21. LARSSSEN (A.). — Calcite. *Uppsala Univ. Arsskr.*, 1929; *Mat. och Naturw.*, 1, p. 122.
22. LAVES (F.). — Die Bau-Zusammenhänge innerhalb des Kristallstruckturen. II Teil. *Zeitschr. f. Krist.*, 73, 1929, p. 320.
23. LENGYEL (E. V.). — Zum Problem der Sphärokristalle. *Zeitschr. f. Krist.*, 97, 1937, pp. 67-87.
24. LUCAS (G.). — 1° Communication Soc. Fr. Min. *Bull. Soc. Fr. Min.*, 69, 1946, p. 10. — 2° Quelques observations sur la vaterite cristallisée, sa préparation et sa transformation en calcite. *Bull. Soc. Fr. Min.*, 70, 1947, pp. 185-191. — 3° *C. R. Ac. Sc.*, 225, 1947, p. 745.
25. LUNDE (G.). — Ueber die Kristallart des Calciumcarbonates in Otolithen von *Gadus morhua*. *Biochem. Zeitschr.*, 206 (4/6), 1929, pp. 436-439.
26. MATÉI (PRUNA), FAIVRE (R.) et CHAUDRON (G.). — *C. R. Ac. Sc.*, 227, 1948, p. 390.
27. MAYER (F. K.). — Röntgenographische Untersuchungen an Gastropodenschalen. *Jenaische Zeitschr. Naturwiss.*, 65, 1931, pp. 487-512.
28. MAYER (F. K.). — Recherches aux rayons X sur les modifications du CO_3Ca dans la coquille des Gastropodes. *Chimie der Erde*, 6, 1931, pp. 239-252.
29. IBID. — Recherches aux rayons X sur les modifications du CO_3Ca dans la coquille et le squelette d'organismes récents et fossiles. *Chimie der Erde*, 7, 1932, pp. 346-350.
30. MAYER (F. K.) et WEINECK (E.). — Die Verbreitung des Kalziumkarbonates im Tierreich unter besonderer Berücksichtigung der Wirbellosen. *Jenaische Zeitschr. f. Naturwiss.*, 66, 1932, pp. 199-222 (Bibliographie).
31. NAHMIA (M. E.). — Analyse cristalline quantitative au moyen des rayons X. *Zeitsch. f. Krist.*, 83, 1932, pp. 329-339. *Z. f. Krist.*, 85, p. 319.
32. OLSHAUSEN (S. v.). — *Zeitschr. f. Krist.*, 61, 1925, pp. 463-514.
33. SCHMIDT (W. J.). — Die Bausteine des Tierkörpers im polarisierten Licht. *Bonn.*, 1924.
34. STOLKOWSKI (J.). — La vaterite et les formes minéralogiques du calcaire. *C. R. Ac. Sc.*, 225, 1947, pp. 312-314.
35. IBID. — Quelques précisions sur l'analyse quantitative par les rayons X de mélanges binaires et ternaires de carbonate de calcium anhydre. *C. R. Ac. Sc.*, 226, 1948, pp. 933-934.
36. TAYLOR (A.). — *Phil. Mag.*, 35, 1944.
37. TSUTSUMI (J.). — *Memoirs Coll. Sc. Kyoto Imp. Univ.*, sér. A, II, 1928, pp. 217-401.
38. ULRICH (FR.). — *Zeitsch. f. Krist.*, 66, 1927, pp. 513-515.
39. WYCKOFF (R. W. G.), GIBSON (R. E.) et MERWIN (H. E.). — Vaterit. *Amer. J. Sci.*, 10, 1925, pp. 325-333.
40. WYCKOFF (R. W. G.). — Structure de l'aragonite. *Amer. J. Sci.*, 9, 1925, p. 145. Structure de la calcite. *Amer. J. Sci.*, 50, 1920, p. 317.

PHYSIOLOGIE

41. ANDERSON (D. J.) et THOMSON (L. C.). — Sulphanilamide inhibition of carbonic anhydrase in whole blood. *J. Phys.*, 107, 1948, pp. 203-210.
42. ASHBY (W.) et CHAN (D. V.). — Determination of carbonic anhydrase in human autopsy tissue. *Journ. Biol. Chem.*, 151 (2), 1943, pp. 515-519.
43. ASHBY (W.). — Carbonic anhydrase in mammalian tissue. *Journ. Biol. Chem.*, 151 (2), 1943, pp. 521-527.
44. ASHBY (W.). — A parallelism between the quantitative incidence of carbonic anhydrase and functional levels of the central nervous system. *Journ. Biol. Chem.*, 152 (2), 1944, pp. 235-240 et pp. 671-679; 156 (1), 1944, pp. 323-329 et pp. 331-341.
45. ASHBY (W.). — L'anhydrase-carbonique dans le pallium des Primates comparé à celui des Mammifères inférieurs. *Proc. of Soc. for. exper. biol. et Med.*, 67, n° 1, 1948, p. 17.
46. BAKKER (A.). — Ueber Kohlensäureanhydrase in normalen und kataraktösen Linsen. *Albrecht von Graefe's Arch. Ophthalmol.*, 140, 1939, p. 543-552.
47. IBID. — *Ophthalmologica*, 103 (2), 1942, pp. 88-94.
48. IBID. — Activation and inhibition of carbonic acid anhydrase. *Enzymologia*, 11, 1943, pp. 70-80.

49. BENESCH (R.), BARRON (N. S.) et MAWSON (C. A.). — Carbonic anhydrase, sulfonamides and shell formation in the domestic fowl. *Nature*, 153, 1944, pp. 138-139.
50. BENESCH (R.), CHANCE (M. R. A.) et GLYNN (L. E.). — Inhibition de la calcification osseuse par les sulfamides. *Nature*, 155, 1945, p. 203.
51. BLANC (HÉLÈNE). — *Thèse Lyon*, 1935.
52. BOOTH (V. H.). — Carbonic anhydrase activity inside corpuscles. Enzyme-substrate accessibility factors. *Journ. Physiol.*, 93 (2), 1938, pp. 117-128.
53. IBID. — The carbonic anhydrase inhibitor in serum. *Journ. Physiol.*, 91 (4), 1938, pp. 474-489; et 87, 1936, pp. 41-2 P.
54. BOURNE (G.). — The distribution of alkaline phosphatase in various tissues. *Quart. Jour. Exp. Physiol.*, 32, 1943, pp. 1-21.
55. BRINKMAN (R.) et MARGARIA (R.). — The influence of haemoglobin on the hydration and dehydration velocities of CO₂. *Journ. of Phys.*, 87, 1931, 6 p.
56. BRINKMAN (R.), MARGARIA (L.), MELDRUM (N. U.) et ROUGHTON (F. G. W.). — The CO₂ catalyst present in blood. *Journ. of Physiol.*, 75, 1932, 3 p.
57. BRINKMAN (R.), MARGARIA (R.) et ROUGHTON (F. G. W.). — The kinetics of the carbon Dioxide-carbonique Acid Reaction. *Phil. Trans. Roy. Soc., A*, 232, 1933, pp. 65-97.
58. BRINKMAN (R.). — The occurrence of Carbonic anhydrase in lower marine animals. *Journ. of Physiol.*, 80, 1933, pp. 170-173.
59. BUDDENBROCK (W. v.). — Grundrizz der vergleichenden Physiologie. 2^e Band, 1939, pp. 800-850.
60. CHENYKAEVA (Yn. E.). — Carbonic anhydrase of blood as affected by reduced atmospheric pressure. *Compt. rend. Ac. Sc.. U. R. S. S.*, 47, 1945, pp. 452-455.
61. CLARK (A. M.). — Carbonic anhydrase in *Arenicola marina*. *Nature*, 162, 1948, p. 191. — Détermination of carbonic Anhydrase Activity. *Nature*, 163, 1949, p. 562.
62. COMMON (R. H.). — The carbonic anhydrase activity of the hen's oviduct. *Journ. Agric. Sc.*, 31 (4), 1941, p. 412.
63. DAVENPORT (H. W.). — Gastric carbonic anhydrase. *Journ. Physiol.*, 97 (1), 1939, pp. 32-43.
64. IBID. — The inhibition of carbonic-anhydrase and of gastric acid secretion by thiocyanate. *Amer. Journ. Physiol.*, 129 (3), 1940, pp. 505-514.
65. IBID. — Gastric carbonic anhydrase in dogs. *Am. Journ. Physiol.*, 128 (4), 1940, pp. 725-728.
66. DAVENPORT (H. W.) et WILHELM (A. E.). — Renal carbonic anhydrase. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 48 (1), 1941, pp. 53-56.
67. DAVENPORT (H. W.). — The inhibition of carbonic anhydrase by thiophene-2-sulfonamide and sulfanilamide. *Journ. Biol. Chem.*, 158 (3), 1945, pp. 567-571.
68. IBID. — Carbonic anhydrase in the nervous system. *Journ. Neurophysiol.*, 9 (1), 1946, pp. 41-46.
69. DEY. — Etude biochimique du zinc chez les animaux. *Thèse de Doctorat ès-sciences, Paris*, 1937.
70. DILL (D. B.), FORBES (W. H.). — Blood Gas Transport. *Annual Review of Physiol.*, IX, 1947, pp. 363-364.
71. DIRKEN (M. N. J.) et MOOK (H. W.). — The carriage of carbon dioxide by blood. *Journ. of Physiol.*, 70, 373.
72. EDITORIAL. — Carbonic anhydrase. *Journ. Amer. Med. Assoc.*, 127 (15), 1945, pp. 990-991.
73. FAURHOLT (C.). — *Journ. de Chimie Phys.*, 21, 1925, 400.
74. FEGLER (J.). — Function of carbonic anhydrase in blood. *Nature*, 153, 1944, pp. 137-138.
75. FERGUSON (J. K. W.) et ROUGHTON (F. J. W.). — The direct chemical estimation of carbamine compounds of CO₂ with haemoglobin. *Journ. Physiol.*, 83 (1), 1934, pp. 68-86.
76. FERGUSON (J. K.), LEWIS (L.) et SMITH (J.). — The distribution of carbonic anhydrase in certain marine invertebrates. *Journ. Cellular and Comp. Physiol.*, 10 (3), 1937, pp. 395-400.
77. FLEURY (M. P.). — Les diastases. Notions sur leur cinétique, leur constitution et leur mode d'action. *Exp. annuels Bioch. medic.*, 1939, pp. 83-105.
78. FLORKIN (MARCEL). — Sur l'activité anhydrasique du milieu intérieur des Invertébrés. *Arch. internat. Physiol.*, 40, 3, 1935, pp. 283-290.

79. FLORKIN (M.) et DE MARCHIN (P.). — La distribution de l'anhydrase dans les tissus de l'Anodonte. *Arch. intern. Physiol.*, 51, 1941, pp. 130-132.
80. FREE (A. H.), DAVIES (D. F.) et MYERS (V. C.). — Effect of sulfanilamide accompanied by acid or alkali upon the acid-base equilibrium of the dog. Possible influence of carbonic anhydrase. *Journ. Biol. Chem.*, 147 (1), 1943, pp. 167-173.
81. FREEMAN (J. A.) et WILBUR (K. M.). — Carbonic anhydrase in Molluscs. *Biol. Bull.*, 94 (1), 1948, pp. 55-59.
82. GOMORI (G.). — The distribution of phosphatase in normal organs and tissues. *Journ. Cell. Comp. Physiol.*, 17, 1941, pp. 71-83.
83. GOOR (H. VAN). — La répartition de l'anhydrase-carbonique dans l'organisme des animaux. *Arch. internat. Physiol.*, 45 (4), 1937, pp. 491-509.
84. IBID. — Das Vorkommen von Kohlensäureanhydrase in den Kiemen von Avertebraten. *Acta Brevia Neerland.*, 9 (2/3), 1939, pp. 62-64.
85. IBID. — Die Verbreitung und Bedeutung der Carbonanhydrase. *Enzymologia*, 8, 1940, pp. 113-128 (Bibliographie).
86. IBID. — The carbonic anhydrase in serum. *Acta Brev. Neerland.*, 11 (10), 1941, pp. 218-220.
87. IBID. — Factors in plasma influencing the action of carbonic anhydrase. *Arch. néerland. Physiol.*, 27, 1943, pp. 393-400.
88. IBID. — Inhibition of carbonic anhydrase by sulfanilamide. *Enzymologia*, 11, 1944, pp. 174-177.
89. IBID. — A thermostable and a thermolabile factor of carbonic anhydrase. *Onderzock. Physiol. Lab. Rijks Univ. Utrecht*, 8, Pt. 3, 1943.
90. IBID. — Carbonic anhydrase. *Onderzoekingen, Utrecht*, 1947-1948.
91. IBID. — Carbonic anhydrase. Its properties, distribution and significance for carbon dioxide transport. *Enzymologia XIII*, fasc. 2-3, 1948.
92. GUGGENHEIM (E. A.). — On the Determination of the Velocity Constant of a Unimolecular Reaction. *Phil. Mag.*, 2, 1926, pp. 538-543.
93. GUTOWSKA (M. S.) et MITCHELL (C. A.). — Carbonic anhydrase in the calcification of the egg shell. *Poultry Sc.*, 24, 1945, pp. 159-167.
94. HENRIQUÈS (O. M.). — *Biochem. Its.*, 200, 1, 1948.
95. HODGSON (T. H.). — The carbonic-anhydrase content of blood, in pathological states in man. *Brit. J. Exp. Path.*, 17, 1936, pp. 75-80.
96. HOVE (E. C. A.), ELVEHJEM et HART (E. B.). — The relation of zinc to carbonic anhydrase. *Journ. Biol. Chem.*, 136 (2), 1940, pp. 425-434.
97. JACOBS (M. H.) et STEWART (D. R.). — The role of carbonic anhydrase in certain ionic exchanges involving the erythrocyte. *Journ. Gen. Physiol.*, 25 (4), 1942, pp. 539-552.
98. KEILIN (D.) et MANN (T.). — Carbonic anhydrase. *Nature*, 144, 1939, p. 442.
99. IBID. — Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem. Journ.*, 34 (8/9), 1940, pp. 1163-1176.
- 99 bis. IBID. — Sulfanilamide as a specific inhibitor of carbonic anhydrase. *Nature*, 146, 1940, pp. 164-165.
100. KEILIN (D.) et MANN (T.). — Activity of carbonic anhydrase within red blood corpuscles. *Nature*, 148 (3756), 1942, pp. 493-496.
- 100 bis. IBID. — Activity of purified carbonic anhydrase. *Nature*, 153 (3873), 1944, pp. 107-108.
101. KIESE (M.) et HASTINGS (A. D.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 61 (1291), 1939; *Science*, 88, 242, 1938.
102. KIESE (M.) et HASTINGS (A. D.). — Catalytic hydration of carbon dioxide. *J. Biol. Chem.*, 132, 1940, pp. 267-280.
103. KIESE (M.) et HASTINGS BAIRD (A.). — Factors affecting the activity of carbonic-anhydrase. *Journ. Biol. Chem.*, 132 (1), 1940, pp. 281-292.
104. KIESE (M.). — Wirkungen des Kohlendioxyds. *Biochem. Zeitschr.*, 305, 1940, pp. 22-56.
105. IBID. — Die Aktivierungsenergie der Reaktion zwischen Kohlendioxyd und Wasser. *Biochem. Zeitschr.*, 307, 1941, pp. 207-214.
106. IBID. — Kinetic der Kohlensäureanhydrase. *Biochem. Zeitschr.*, 307, 1941, pp. 400-413.
107. IBID. — The activation of carbonic acid anhydrase. *Naturwissenschaften*, 29, 1941, pp. 116-117.

108. IBID. — Carbonic anhydrase and glutathione. *Naturwissenschaften*, 30, 1942, pp. 122-123.
109. IBID. — Ueber Kohlensäureanhydrase. Bemerkungen zu Veröffentlichungen von M. Leiner. *Biochem. Zeitschr.*, 313 (5/6), 1943, pp. 419-427.
110. KRASOVITSKAYA (S. E.), STRELTSOV (V. V.) et SYRKINA (P. E.). — Activity of carbonic anhydrase in disturbances of acid-alkaline balance in the organism. *Bynll. Ekspil. Biol. Med.*, 19, 1945, pp. 55-58.
111. KREPS (E. M.) et CHENYKAEVA (R.). — Carbonic anhydrase in crustaceans. *Compt. rend. Acad. Sc. U. R. S. S.*, 34, 1942, pp. 101-104.
112. KREPS (E. M.). — Enzymic activity of carbonic anhydrase. *Compt. rend. Acad. Sc. U. R. S. S.*, 45, 1944, pp. 197-198.
113. IBID. — Carbon anhydrase as a respiratory enzyme in physiology and pathology. *Uspekhi Soviemennoi Biologii* (Achievements in Modern Biol.), 17 (2), 1944, pp. 125-157.
114. LEINER (M.). — Die Augenkiemendrüse der Knochenfische. *Zeitschr. vergl. Physiol.*, 26, 1938, p. 416.
115. LEINER (M.) et LEINER (G.). — Das Ferment Kohlensäurehydratase im Tierkörper. *Biol. Zentralbl.*, 60 (9/10), 1940, pp. 449-472.
116. LEINER (M.). — The enzyme carbonic anhydrase in the animal body. *Naturwissenschaften*, 28, 1940, pp. 316-317.
117. IBID. — The carbonic anhydrase content of tissues and blood. *Naturwiss.*, 29, 1941, pp. 468-469. *Chem. Zentr.*, 1, 1942, p. 882.
118. LEINER (M.) et LEINER (G.). — Der Gehalt an Zink und Kohlensäureanhydratase in den Augen, in anderen Organen und im Blut von Wirbeltieren. *Naturw.*, 29 (50/51), 1941, pp. 763-765. *Naturw.*, 29, pp. 195-197.
119. IBID. — Methods for study of the catalytic activity of carbonic anhydrase. *Biochem. Z.*, 311, 1942, pp. 119-145.
120. LEINER (M.). — Ueber Kohlensäureanhydratase. *Biochem. Zeitschr.*, 315 (1/2), 1943, pp. 31-40.
121. IBID. — Activators and stabilizers of carbonic anhydrase. *Klin. Wochschr. Naturw.*, 30, 1942, pp. 240-242.
122. IBID. — Promotion and inhibition of carbonic acid anhydrase by materials from mammal blood. *Naturw.*, 32, 1944, pp. 202-206.
123. LOCKE (A.), MAIN (E. R.) et MELLON (R. R.). — Carbonic anhydrase inactivation as the source of sulfanilamide « acidosis ». *Science*, 93 (2403), 1941, pp. 66-67.
124. MAETZ (JEAN). — L'activité anhydrique de quelques tissus d'Invertébrés. *Bull. Inst. Océan. Monaco*, n° 899, 1946.
125. MAIN (E.) et LOCKE (A.). — Carbonic anhydrase. I. Factors affecting activity. *Journ. Biol. Chem.*, 140 (3), 1941, pp. 909-918.
126. IBID. — Carbonic anhydrase. II. Zinc in its relation to carbonic anhydrase activation and inactivation. *Journ. Biol. Chem.*, 143 (3), 1942, pp. 729-736.
127. MARGARIA (R.) et FERRARI (R.). — Regeneration of carbonic anhydrase of the blood in a perfused frog. *Boll. Soc. ital. biol. sper.*, 12, 1937, pp. 572-573.
128. IBID. — La régénération della anidrase carbonica del sangue nella rana salata. *Enzymologia*, 2 (2), 1937, pp. 117-120.
129. MELDRUM (N. U.) et ROUGHTON (F. G. W.). — The CO₂ catalyst present in blood. *Journ. of Physiol.*, 75, 3 p. et 15 p., 1932.
130. MELDRUM (N. U.) et ROUGHTON (F. G. W.). — Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *Journ. of Physiol.*, 80 (2), 1933, pp. 113-142.
131. IBID. — The state of carbon dioxide in blood. *Journ. of Physiol.*, 80 (2), 1933, pp. 143-170.
132. IBID. — Carbonic Anhydrase and the State of Carbon-Dioxide in Blood. *Nature*, 131, 1933, pp. 874-875.
133. MENDIVE (J. R.). — Carbonic anhydrase. *Medicina*, Buenos-Ayres, 3, 1943, pp. 366-374.
134. MITCHELL (C. A.), POZZANI (V. C.) et FESSENDEN (R. W.). — A method for determining carbonic anhydrase activity by the use of unimolecular velocity constants. *J. Biol. Chem.*, 160, 1945, pp. 283-285.
135. NUMANOI (H.). — Extension of the distribution of carbonic anhydrase. *Science* (Japan), 11, 1941, p. 98.

136. PETERMANN (M. L.) et HAKALA (N. V.). — Molecular kinetic and electrophoretic studies on carbonic anhydrase. *Journ. Biol. Chem.*, 145 (2), 1942, pp. 701-705.
137. PHILPOT (F. J.) et PHILPOT (JOHN ST L.). — A modified colorimetric estimation of carbonic anhydrase. *Bioch. Journ.*, 30, 1936, pp. 2191-2193.
138. ROBERTSON (K.) et FERGUSON (J. K. W.). — The distribution of carbonic anhydrase in some invertebrates. *Amer. Journ. Physiol.*, 116, 1936, p. 130.
139. ROUGHTON (F. J. W.) et FERGUSON (J. K. W.). — The direct chemical estimation of carbamino compounds of Co₂ with haemoglobin. *Journ. Physiol.*, 83 (1), 1934, pp. 68-86.
140. ROUGHTON (F. J. W.). — Carbonic anhydrase. *Akademische Verlagsgesellschaft. Leipzig*, 1934.
141. ROUGHTON (F. J. W.) et BOOTH (V. H.). — The catalytic effect of buffers on the reaction : $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CO}_2\text{H}_2$. *Biochem. Journ.*, 32 (11), 1938, pp. 2049-2069.
142. *IBID.* — The effect of substrate concentration, pH and other factors upon the activity of carbonic anhydrase. *Biochem. Journ.*, 40, 1946, pp. 309 et 319-330.
143. ROUGHTON (F. J. W.) et BOOTH (V. H.). — The manometric determination of the activity of carbonic anhydrase under varied conditions. *Biochem. J.*, 40, 1946, p. 309.
144. SCHMIDT (F.) et FRIGGE (H.). — Action of carbonic anhydrase on mineral metabolism in different conditions. *Deut. Arch. klin. Med.*, 185, 1939, pp. 245-257.
145. SCHMIDT (B. E. C.). — Cataphoretic behavior of carbonic anhydrase. *Biochem. J.*, 34, 1940, p. 1176.
146. SCOTT (D. A.). — Crystalline preparation of carbonic anhydrase. *Journ. Biol. Chem.*, 142 (2), 1942, pp. 959-960.
147. SCOTT (D. A.) et FISHER (A. M.). — Carbonic anhydrase. *Journ. Biol. Chem.*, 144 (2), 1942, pp. 371-381. *Nature*, 153, 1944, pp. 711-712.
148. SCOTT (D. A.) et MENDIVE (J. R.). — Observations on carbonic anhydrase. *Journ. Biol. Chem.*, 139 (2), 1941, pp. 661-674. *Journ. Biol. Chem.*, 140 (2), 1941, pp. 445-451.
149. SHISKIN (CECILIA). — Carbonic anhydrase in the blood of normal und diabetic subjects. *Tubercle*, 21, 1941, pp. 322-329.
150. SOBOTKA (H.) et KANN (S.). — Carbonic anhydrase in fishes and invertebrates. *Journ. Cell. and Comp. Physiol.*, 17 (3), 1941, pp. 341-348.
151. STADIE (W. C.), RIGGS (B. C.) et HAUGAARD (N.). — Oxygen poisoning. VI. The effect of high oxygen pressure upon enzymes : Pepsin, catalase, cholinesterase and carbonic anhydrase. *J. of Biol. Chem.*, 161, 1945, pp. 178-180.
152. STEWART (D. R.) et JACOBS (M. H.). — The role of carbonic anhydrase in the catalysis of ionic exchanges by bicarbonates. *Biol. Bull.*, 81 (2), 1941, p. 294.
153. *IBID.* — The role of carbonic anhydrase in certain ionic exchanges involving the erythrocytes. *J. Gen. Physiol.*, 25, 1942, pp. 539-552.
154. STOLKOWSKI (J.). — Inhibition de l'anhydrase-carbonique par l'eau de mer. *C. R. Ac. Sc.*, 228, 1949, p. 1456.
155. *IBID.* — Transformations de l'anhydrase-carbonique par dilution. Conséquences biologiques. *C. R. Acad. Sc.*, 230, 1950, p. 574.
156. TOMLINSON (W. J.) et JAMES (E. J.). — Sickla-cell formation in normal saline, plasma and serums with carbonic anhydrase inhibitors. *J. Lab. Clin. Med.*, 30, 1945, pp. 107-111.
157. TUCKER (H. F.) et BALL (G. E.). — The activity of carbonic anhydrase in relation to the secretion and composition of pancreatic juice. *Journ. Biol. Chem.*, 139 (1), 1941, pp. 71-80.
158. VALLÉE (B. L.) et ALTSCHULE (M. D.). — Zinc in the Mammalian Organism, with particular reference to carbonic anhydrase. *Physiological reviews.*, 29, n° 4, 1949, pp. 370-388 (Bibliographie).
159. WOLVERKAMP (H. P.). — Acid and carbon dioxide transport in blood which contains hemocyanin. *Naturw. Tijdschr.*, 20, 1938, pp. 256-259.
160. ZOTAYA (J.). — Acción de la sulfanilamida sobre la anhidrasa carbónica. *Rev. Inst. Salubridad y Enferm. Trop.*, 2 (1), 1941, pp. 19-27.

BIOLOGIE. — CALCIFICATION

161. ALEXANDER (A. E.). — The rate of seasonal deposition of pearl aragonite. *Science*, 93 (2-405), 1941, pp. 110-111.
162. BAECKER (R.). — Histologischer Kalknachweis. *Mikrokosmos* (Stuttgart), 23 (8), 1930, pp. 126-127.
163. BAYLE (J.). — Biochimie des Mollusques. *Thèse Lyon*, 1942.
164. BEVELANDER (G.) et BENZER (P.). — Calcification in Marine Molluscs. *Biol. Bull.*, 94, n° 3, 1948.
165. BLANC (MAURICE). — Etude histologique de la régénération des nageoires chez quelques Poissons téléostéens. *Arch. Anat. microsc. et morph. exp.*, 38, n° 1, 1949.
166. BOGGILD (O. B.). — The shell structure of the Mollusks. *Mémoires Acad. Roy. des Sc. et Lett. Danemark*, sér. 2, 1930, pp. 235-326.
167. BOUXIN (H.). — Recherches d'Ecologie naturelle et expérimentale sur quelques Lamelli-branches de la zone des marées (*Cardium*, *Mytilus*, *Tapes*). Le milieu, l'individu, la population. *Thèse Paris*, 1946.
168. BRUNI (G.). — La scelta dei catalizzatori mediante la legge sulla crescita a somiglianza. *La Chimica*, Roma, 1943.
169. BRUNI (G.) et TROMBARA (C.). — Analyses et composition chimique des coquilles de quelques Mollusques. *Chimica, Ital.*, 3, 1948, pp. 91-93.
170. CARTIER (P.). — Les constituants minéraux des tissus calcifiés. - I. Structure minérale de l'os, de la dentine et du ciment. II. Structure moléculaire du sel de l'os. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, XXX, n° 1-2, 1948, pp. 65-73. - III. La fraction phosphocalcique liée aux protéines osseuses. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, XXXI, n° 2, 1949, pp. 432-439.
171. CAUSSÉ (R.). — Technique de l'examen histologique de l'os. *Bull. hist. app. Phys. et Pathologie*, XXIII, n° 4, 1946, pp. 86-92.
172. CLÉMENT et RIVIÈRE. — *C. R. Ac. Sc.*, 174, 1922, p. 1353.
173. CRÉTIN (A.). — De quelques méthodes de recherche du P et de la chaux dans les tissus. *Thèse Médecine, Paris*, 1923. - Contribution à l'étude de l'évolution tardive du cal dans une fracture expérimentale à consolidation accélérée. *Gaz. méd. France*, n° 15, 1930.
174. CRÉTIN (A.) et POUYANNE (L.). — Action de quelques métaux sur la consolidation osseuse (Contribution à l'étude de l'ostéosynthèse). *Bordeaux chirurgical*, 1933. - Détails histo-chimiques de l'ostéogenèse. *Compt. rend. Ass. Anatom.*, 32^e réun., Marseille, 1937.
175. DALLEMAGNE (M.). — Données récentes sur la nature et le métabolisme de l'os. *Actualités Bioch.*, 2, 1945.
176. DALLEMAGNE (M.) et MELON (J.). — La localisation de l'apatite et du phosphate tricalcique dans l'émail dentaire. *Arch. Biol.*, LVII, fasc. 1, 1946. - La calcification des lamelles osseuses constitutives du système haversien. *Arch. Biol.*, LVI, fasc. 2, 1945.
177. DALLEMAGNE (M. J.), BRASSEUR (H.) et MELON (J.). — L'existence du phosphate tricalcique α $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]^{3-} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot (\text{OH})^2$. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, XXI, n° 2, 1949, pp. 425-431.
178. DOTTERWEICH (H.). — Die Funktion tierischer Kalkablagerungen als Pufferreserve im Dienste der Reaktionsregulation. Die Kalkdrüsen des Regenwurms. *Pflüger's Arch. Ges. Physiol.*, 232 (2), 1933, pp. 263-286.
179. DUDICH (E.). — Die Kalkeinlagerungen des Crustaceenpanzers im polarisiertem Licht. *Zool. Anzeiger*, 85, 1929, pp. 257-264.
180. DUGAL (L. P.) et IRWING (L.). — Sécrétion du CO_2Ca par *Venus mercenaria* fermée hermétiquement. *C. R. Soc. Biol.*, 75, 124, 1937, p. 526.
181. FAURE-FRÉMIET (E.), STOLKOWSKI (J.) et DUCORNET (J.). — Etude expérimentale de la calcification tégumentaire chez un infusoire cilié *Coleps hirtus*. *Biochemica et Biophys. Acta.*, 2, 1948, pp. 668-673.
182. FONTAINE (M.). — Le Ca sanguin chez les Cyclostomes et les Poissons. Ses rapports avec l'état d'ossification du squelette. *Arch. intern. Physiol.*, 1935, p. 374.
183. FRANC (A.). — Véligères et Mollusques Gastéropodes des baies d'Alger et de Banyuls. *Journ. de Conch.*, LXXXVIII, 1948.

184. FRIZA (F.). — Zur Kenntnis des Conchiolins der Muschelschalen. *Biochem. Z.*, 246, 1932.
185. HARTING (P.). — Recherches de Morphologie synthétique sur la production artificielle de quelques formations calcaires organiques. *Naturk. Verhand. d. Ak. Amsterdam.*, 1872.
186. HORWOOD. — On the layers of the molluscan shells. *Geol. Mag. N. S. VIII*, n° 9, 1911, p. 406.
187. HOSOI (K.). — Contribution to the biochemistry of the coral. VI. Calcium and carbonate in the skeleton of *Fungia actiniformis* var. *palawensis* Döderlein. *Palao Trop. Biol. Sta. Stud.* (Tokyo), 2 (1), 1940, p. 5759.
188. KESSEL (E.). — Ueber Aufhebung von Formdoppelbrechung durch Druck, gezeigt am periostracum, vom *Mytilus edulis*. *Z. Mikrosk.*, 57, 1940.
189. KESSEL (E.). — Ueber den feineren Bau des Mytiliden-Periostracum, erschlossen aus der Optik. *Z. Morphol. und Ökologie der Tiere*, 36, 1940, p. 581.
190. KLEINHOLZ (L. H.). — Molting and Calcium deposition in decapod crustaceans. *Journ. Cell. and Comp. Physiol.*, 18 (1), 1941, pp. 101-107.
191. KÜHNELT (W.). — Beziehungen zwischen Kalkstoffwechsel und Atmung bei Mollusken der Meeresküste. *Zool. Anz.*, 124 (7), 1938, pp. 182-190.
192. KUNIKE (G.). — Nachweis und Verbreitung organischen Skelettsubstanzen bei Tieren. *Z. vergl. Physiol.*, 2, 1925.
193. LAIS (R.). — Die Beziehungen der gehäusetragenden Landschnecken Südwestdeutschlands zum Kalkgehalt des Bodens. *Arch. Molluskenkunde*, 75, 1943, pp. 33-67.
194. LEENHARDT (H.). — Quelques études sur « *Gryphea angulata* ». *Ann. Inst. Océan.*, III, fasc. 1, 1926.
195. LERICHE et POLICARD. — Quelques problèmes relatifs à la physiologie de l'os. Masson, 1926.
196. LEVETZOW (K. G. von). — Die Struktur einiger Schneckenschalen und ihre Entstehung durch typisches und atypisches Wachstum. *Jena'sche Zeitschr. Naturw.*, 66 (1), 1932, pp. 41-108 (Bibliographie).
197. ISID. — Ueber Schalenkulpturen und ihre Entstehung bei einigen Muriciden. *Jena'sche Zeitschrift Naturw.*, 69, 1934, pp. 1-14.
198. MANIGAULT (P.). — Recherches sur le calcaire chez les Mollusques. Phosphatase et précipitation calcique. Histochimie du calcium. *Ann. Inst. Océan.*, XVIII, fasc. 5, 1939, pp. 332-426 (Bibliographie).
199. MONNIER (A. M.) et BONNET (V.). — L'action décalcifiante des phosphates et son rôle fonctionnel. *Arch. des Sc. physiol.*, 1, n° 1, 1947, pp. 91-109.
200. MOYNIER DE VILLEPOIX (R.). — Note sur la croissance de la coquille d'*Helix aspersa*. *C. R. Ac. Sc.*, II, 1891, p. 317.
201. ISID. — Recherches sur la formation de la coquille des Mollusques. *Journ. Anat. et Physiol.*, XXVIII, 1892, pp. 461-515, 582-674 (Bibliographie).
202. ISID. — Sur la réparation de la coquille chez *Helix aspersa*. *Bull. Soc. Zool. France*, 1892, p. 30.
203. PFEIFFER (K. L.). — Le calcaire dans le métabolisme des Mollusques. *Arch. Molluskunde Dtsch.*, 76, 1947, pp. 69-70.
204. PRASHAD (J. B.). — The Mantle and the shell of Viviparidae. *Mem. of the Ind. Mus.*, Kalkutta, 1928.
205. PRENANT (M.). — Contributions à l'étude cytologique du calcaire. I. Quelques formations calcaires du conjonctif chez les Gastéropodes. *Bull. Biol. Franco-Belge*, XLVIII, 1924, fasc. 3, pp. 331-378.
206. ISID. — Contributions à l'étude cytologique du calcaire. II. La genèse des spicules calcaires chez les Didemnidés. *Bull. Biol. Franco-Belge*, LIX, 1925, pp. 403-435.
207. ISID. — Contributions à l'étude cytologique du calcaire. III. Observations sur le déterminisme de la forme spiculaire chez les larves pluteus d'Oursin. *Bull. Biol. Franco-Belge*, LX, 1926, pp. 522-560.
208. ISID. — Contributions à l'étude cytologique du calcaire. IV. La vatérite chez les animaux. *Bull. Biol. Franco-Belge*, LXII, 1928, pp. 21-50.
209. ISID. — Sur le déterminisme de la forme spiculaire chez les larves d'Oursin. *C. R. Soc. Biol.*, XCIV, 1926, pp. 433-435.

210. IBID. — Recherches sur le calcaire chez les êtres vivants. La stabilité du calcaire amorphe et le tégument des Crustacés. *Ann. Physiol. et Physicoch. biol.*, V, 1927, pp. 818-844.
211. IBID. — Les formes minéralogiques du calcaire chez les êtres vivants et le problème de leur déterminisme. *Biol. Rev. et Biol. Proc. Cambridge Phil. Soc.*, 2 (4), 1927, pp. 365-393 (Bibliographie). *Bull. Soc. Philomat. Paris*, 18 (1), 1929, pp. 18-24.
212. IBID. — Le polymorphisme du calcaire, problème biologique. *Ann. et Bull. Soc. Roy. Sc. Méd. et Nat. Bruxelles*, n° 1-2, 1930, pp. 31-41.
213. PRICE-JONES (C.). — The relations of diameter and height to the squattness of shells (*Cepea nemoralis*). *Proc. Malac. Soc.*, XIX, 1930, pp. 146-152.
214. RANSON (G.). — Les Huitres et le calcaire. *Bull. Mus.*, 2° s., XI, n° 5, 1939; XII, n° 7, 1940; XIII, n° 1, 1941.
215. REICHERT (W.). — Die Schalenmerkmale der Gartenschnecke. *Zeitschr. f. Morph. u. Ökol. der Tiere*, 11, Heft 5, 1926, pp. 624-666.
216. ROBERTSON (J. D.). — The function and Metabolism of calcium in the invertebrata. *Biol. Rev.*, 16, 1941, pp. 106-129.
217. ROCHE (J.). — Quelques problèmes biochimiques généraux posés par l'ossification. *Exp. annuels Bioch. médic.*, 1939, pp. 237-262.
218. IBID. — La phosphatase des os (Biochimie normale et pathologique). *Exp. annuels Bioch. médic.*, 1942, pp. 251-269.
219. IBID. — Les phosphatases dans le métabolisme du calcium. *Ann. nutrition et alimentation*, 1, fasc. 1, 1947.
220. ROTH. — Zur Kenntniss des Epithels und der Entwicklung der einzelligen Hautdrüsen von *Helix pomatia*. *Diss. Marburg*, 1929.
221. SCHILDER. — Untersuchungen an den Jugendformen der Cypraeiden-schalen. *Arch. Mollusk.*, 75, 1943, pp. 201-204.
222. SIMROTH (H.). — Ein Vorschlag, die Bezeichnung « Conchiolin » durch « Conchin » zu ersetzen. *Zool. Anz.*, 20, 1897.
223. STOLKOWSKI (J.). — Sur l'inhibition du développement des spicules chez la larve d'Oursin. *C. R. Ac. Sc.*, 227, 1948, pp. 867-869.
224. TRÜBSBACH (P.). — Der Kalk im Haushalt der Mollusken. *Arch. Molluskenk.*, 75, 1943, pp. 1-23. *Ann. Mag. Nat. Hist.*, 8, 1941, pp. 1-33.
225. WAELE (A. DE). — Le sang d'*Anodonta cygnea* et la formation de la coquille. *Nouv. Mém. Cl. Sc. Acad. Roy. Belg.*, 2° sér., X, 1930, pp. 1-51.
226. WETZEL (G.). — Die organischen Substanzen der Schalen von *Mytilus* und *Pinna*. *Hoppe Seylers Z.*, 29, 1900.

CHIMIE ET PHYSICO-CHIMIE

227. BARILLÉ (A.). — Phosphates de Ca. Action de l'ammoniaque sur leurs dissolutions acides. Action de l'acide carbonique sous pression. *Thèse Doct. Univ. Paris*, 1900.
228. BODLÄNDER (G.). — Ueber die Löslichkeit der Erdalkalikarbonate in kohlensäurehaltigem Wasser. *Zs. phys. Chem.*, 35, 1900, pp. 23-32.
229. BUCH (K.). — Ueber die Alkalinität, Wasserstoffionenkonzentration, Kohlensäure und Kohlensäureretension. *Soc. Scient. Fennica*, n° 14, 1917.
230. BUNTIN (A. P.) et BUIKOV (M. M.). — The formation of bicarbonates in the system calcium carbonate-water, carbon dioxide-potassium sulfate. *J. Applied Chemie (U. R. S. S.)*, 8, 1935, pp. 19-24.
231. BUYTENDYK, JACOB (J.), BRINKMAN (R.) et MOOK (H. W.). — A study of the system carbonic acid, carbon dioxide and water. I. Determination of the true dissociation constant of carbonic acid. *Biochem. Journ.*, 21 (3), 1927, pp. 576-584.
232. CAVAZZI (A.). — Sulla composizione e solubilità del carbonato acido di calcio. *Gazz. Chim. ital.*, 46, 1916, p. 122.

233. CLAFF, LLOYD (C.) et SWENSON (O.). — Microglass electrode technique for determination of hydrogen ion activity of blood and other biological fluids. *Journ. Biol. Chem.*, 152 (3), 1944, pp. 519-522.
234. ENGEL (R.). — Sur la loi de Schloesing relative à la solubilité du carbonate de chaux par l'acide carbonique. *C. R. Acad. Sc.*, 101, 1885, p. 949; *Ann. Chim. et Phys.*, 13 (6), 1888, p. 344.
235. FRANQUIN (J.) et MARÉCAUX (P.). — Etude de l'équilibre $\text{CO}_2\text{Ca}-\text{CO}_2-\text{H}_2\text{O}$. *Communicat. au XVIII^e Cong. Chimie Industrielle* et publication de la *Station de Recherches Hydrologiques de Nancy*, 1939.
236. FREAR et JOHNSTON (J.). — The solubility of calcium carbonat (calcite) in certain aqueous solutions at 25°. *J. Amer. Chem. Soc.*, 51, 1929, p. 2082.
237. GREENBERG (D. M.) et LARSON (CL. E.). — Relation of calcium proteinate and colloidal tri-calcium phosphate to the partition of calcium in the blood stream. *J. Phys. Chem.*, 43, 1939, pp. 1139-1150.
238. GREENBERG (D. M.). — The interaction between the alcali earth cations, particularly Ca, and proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 1944, pp. 121-151.
239. GREENWALD (J.). — Dissociation of same calcium salts. *Journ. Biol. Chem.*, 124 (2), 1938, pp. 437-452.
240. IBID. — The dissociation of calcium and magnesium carbonates and bicarbonates. *Journ. Biol. Chem.*, 141 (3), 1941, pp. 789-796.
241. HAEHNEL (O.). — Ueber die Löslichkeit des Calcium-carbonats in kohlensäurehaltigem Wasser unter hohen Drucken und die Eigenschaften solcher Lösungen. *J. für praktische Chem.*, 107, 1924, pp. 165-176.
242. HARNED (H.) et SCHOLES (S. R.). — The ionisation constant of CO_2H^- from 0° to 50° *J. Am. Chem. Soc.*, 63, 1941, pp. 1706-1709.
243. HASTINGS (A. B.), DANIELSON (T. S.) et CHU (H. T.). — The pK'I of carbonic acid in concentrated protein solution and muscle. *J. Biol. Chem.*, 131, 1939, pp. 243-257.
244. JOHNSTON (J.) et WILLIAMSON (E. D.). — The complete solubility curve of calcium carbonate. *J. Amer. Chem. Soc.*, 38, 1916, p. 975.
245. KAUKO (Y.) et MANTERE (V.). — The second dissociation constant of carbonic acid. *Snomen Kemistilehti*, 8B, 1935, p. 34. *Z. physik. Chem.*, A, 176, 1936, pp. 187-201.
246. KAUKO (Y.) et AIROLA (A. K.). — The second dissociation constant of carbonic acid. *Snomen Kemistilehti*, 10 B, 1937, p. 7; *Z. physik. Chem.*, A, 179, 1937, pp. 307-313.
247. KENDALL. — Solubilité des diverses variétés de CO_2Ca . *Phil. Mag.*, 23 (6), 1912, pp. 958-976.
248. HOHLSCHÜTTER (V.) et EGG (C.). — Ueber somatoide Bildungsformen. *Helv. Chim. Acta*, 8, 1925, pp. 457-697.
249. LEGENDRE (R.). — La concentration en ions hydrogène de l'eau de mer. Le pH. *Presses Univ. France*, 1925.
250. MAC CANCE et SHACKLETON (L. R. B.). — The metallic constituents of marine gastropods. *Journ. Mar. Biol. Ass. United Kingdom*, 22 (1), 1937, pp. 269-271 et 273-278.
251. MAC COY (H. N.) et SMITH (H. J.). — Equilibrium between alkali-earth carbonates, carbon dioxide and water. *J. Amer. Chem. Soc.*, 33, 1911, p. 468.
252. MAC INNES (A.) et BELCHER (DONALD). — The thermodynamic ionization constants of carbonic acid at 38° from electrometric-force measurements. *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 1935, pp. 1683-1685.
253. MAINZER (F.) et SHEN (T. CH.). — Die Gleichgewichte zwischen CO_2 und Phosphatlösungen (Ein Beitrag zur Theorie der CO_2 -Bindungskurve). *Biochem. Zeitschr.*, 215, (1/3), 1929, pp. 137-151.
254. MEUNIER. — *Chim. Ind.*, 25, 10^e Cong. Chim. Ind., 1931, p. 515.
255. MITCHELL (A. E.). — Studies on the Dolomite System. Part. II. *Journ. Chem. Soc.*, 123, 1923, p. 1887.
256. MOORE (E. W.). — Graphic determination of carbon dioxide and the three forms of alkalinity. *J. Am. Water Works Assoc.*, 31, 1939, pp. 51-66.
257. NITSCHKE (A.). — Ueber die Leitfähigkeit wässriger Calciumbicarbonat haltiger Salzlösungen. *Bioch. Zeitschr.*, 192 (1/3), 1928, pp. 128-131.

258. PASYNSKI (G. A.), ZOLOTAREVA (Z.) et MUKHINA (A.). — Exchange adsorption of neutral salts on proteins. *Acta Physicochim. U. R. S. S.*, 16, 1942, pp. 236-256.
259. SAJANIEMI (ILKKA). — The pH of saturated calcium carbonate solutions. *Acta Chem. Fennica*, 8 B, 1933, p. 8.
260. SCHLOESING (TH.). — Sur la dissolution du CO_2Ca par l'acide carbonique. *C. R. Acad. Sc.*, 74, 1872, p. 1552.
261. SEYLER (CL. A.) et LLYOD (P.). — Studies of the carbonates : Li, Ca and Mg Carbon. *Journ. Chem. Soc.*, 111, 1917, p. 996.
262. SMIRNOW (A. A.). — The determination of the pH of small quantities of liquid and circulating blood with the use of a glass electrode. *J. Physiol. U. S. S. R.*, 26, 1939, pp. 305-313.
263. SMITH (C. L.). — The Great Bahama Bank. II. Calcium carbonate precipitation. *Journ. Mar. Res.*, 3 (2), 1940, pp. 171-189.
264. IBID. — The solubility of calcium carbonate in tropical sea water. *Journ. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom*, 25 (2), 1941, pp. 235-242.
265. STENZINGER et PAULI (W.). — Ueber die Löslichkeitsbeeinflussung schwerlöslicher Kalksalze durch Eiweizkörper und über Kohlensäureverbindungen der Proteine. *Bioch. Zeitschr.*, 205, 1929, pp. 71-103.
266. TREADWELL (F. P.) et REUTER (M.). — Ueber die Löslichkeit der Bikarbonate des Calciums und Magnesiums. *Zeitschr. anorg. Chem.*, 77, 1898, pp. 170-204.
267. VATER (H.). — Ueber den Einfluz der Lösungsgenossen auf die Krystallisation des Calciumcarbonates. *Zeitschr. f. Kristall.*, 21, 1893, pp. 433-489.
268. VETTER (F.). — Beiträge zur Kenntnis der Abscheidungen des kohlensauren Kalkes aus Bikarbonatlösungen. 1° *Chem. Zentr.*, 11, 3, 1910, p. 865; 2° *Zeitschr. f. Kristall.*, 48, 1910, p. 45.
269. VOYNAR (A. O.). — A simple electrode for rapid pH determination in living tissues, and certain data on functional shifts of pH in organs. *Bull. Biol. med. exptl. U. R. S. S.*, 3, 1937, pp. 411-414.
270. WETTE (H.). — Calculation of the accompanying free CO_2 in $\text{CO}_2\text{Ca}-\text{CO}_2$ equilibrium. *Gas. u. Wasserfach.*, 86, 1943, pp. 265-269.
271. WARREN (J. W.) et CHUCKA (J.). — Calcium carbonate and calcium bicarbonate. *Journ. Amer. Med. Assoc.*, 89 (6), 1927, pp. 445-446.

